

**Determinación de una Alternativa Costo-Efectiva de  
Floculación para Cultivos de la Microalga *Chlorella* en el Caribe  
Colombiano**

**Tesis para optar al título de doctor en ingeniería mecánica**

Elaborado por: Leonardo Antonio Di Mare Pareja  
Candidato a Doctor en Ingeniería Mecánica

Director de investigación:  
Antonio José Bula Silvera  
PhD en Ingeniería Mecánica

Programa de Doctorado en Ingeniería Mecánica  
Programa de Ingeniería Mecánica  
División de Ingenierías  
Universidad del Norte  
Barranquilla, 30 de julio de 2019

Tesis Doctoral

**Determinación de una Alternativa Costo-Efectiva de  
Floculación para Cultivos de la Microalga *Chlorella* en el Caribe  
Colombiano**

Realizada por: Leonardo Antonio Di Mare Pareja

Dirigida por: Antonio José Bula Silvera, PhD

Tribunal calificador:

Presidente: Mauricio Carmona García, Doctor

Jurado 1: Francisco Acién Fernández, Doctor

Jurado 2: Marco Sanjuán Mejía, PhD

Jurado 3: Pedro Villalba Amarís, PhD

Programa de Doctorado en Ingeniería Mecánica

Programa de Ingeniería Mecánica

División de Ingenierías

Universidad del Norte

Barranquilla, 30 de julio de 2019

## Agradecimientos

Una tarea tan exigente como una investigación doctoral demanda la ayuda de infinidad de personas, partiendo de los numerosos autores cuyos artículos permitieron desarrollar mi comprensión del fenómeno hasta la infinidad de personas que ayudaron a garantizar la operatividad de todos los equipos empleados; sin olvidar, claro está a los muchos profesores que me ayudaron en la tarea de dominar los marcos teóricos en los que me afianzo y, sobre todo, estimularon mi curiosidad por encontrar explicaciones a la realidad y nuevas formas de hacer las cosas. Pero algunas de esas personas jugaron un papel fundamental en esta investigación y quisiera nombrarlas como una forma de recordarles cuánto aprecio su ayuda.

Comienzo por expresar mis agradecimientos a las instituciones que ayudaron en la financiación de las investigaciones: la Universidad del Norte que declaró a los estudios sobre microalgas como una línea de investigación de especial interés, la Gobernación del Atlántico que incluyó la financiación de varios de estos estudios en la destinación de sus fondos de regalías mineras, y la Universidad de Almería y Cajamar que financian el Centro de Investigación las Palmerillas donde se adelantó buena parte de la experimentación.

También doy las gracias a quienes me apoyaron en una rama del conocimiento distante de mi formación profesional: la biología; en este tema agradezco a Marianella Suárez, microbióloga que se encargó de la conformación del cepario y de la selección de los medios de nutrición para las algas; Alfredo Navas, biólogo que continuó con el trabajo de Marianella y con el cual he sostenido interesantes discusiones sobre muchas de las implicaciones de esta investigación; y Martina Ciardi, quien pacientemente me instruyó en el manejo de varios de los equipos que necesité para la etapa experimental y, sobre todo, adelantó los cultivos axónicos que permitieron realizar los ensayos en esta etapa.

De entre mis profesores, quisiera resaltar las contribuciones de mi asesor de tesis, el ingeniero Antonio Bula y uno de mis jurados, el ingeniero Marco Sanjuán; tanto como profesores, como en su posterior papel en esta investigación, aportaron observaciones valiosas que han permitido desarrollar mi criterio como investigador

y, en más de una ocasión, invaluables sugerencias para salvar obstáculos que la falta de práctica hacía sentir insalvables.

Los otros jurados de este trabajo hicieron también aportes valiosos que ayudaron a su depuración, los ingenieros Francisco Gabriel Acién y Pedro Villalba. Merece especial mención el primero de ellos pues fue quien me abrió las puertas del Centro de Investigación de las Palmerillas y alimentó con valiosísimos aportes mis investigaciones allí.

Por último y con mi más profundo agradecimiento, debo mencionar a mi esposa, Marcela Navia; su dedicación a la investigación y su devoción por los detalles fueron un gran apoyo en muchos de los elementos formales de este trabajo, sin contar su paciencia cuando la investigación nos robaba tiempo común y su insistencia cuando mi tesón desfallecía.

A todos ellos, muchas gracias; habría sido imposible realizar algo tan complejo sin su apoyo incondicional y desinteresado.

## Tabla de contenido

Resumen .....	9
Introducción .....	11
1. Justificación .....	13
2. Antecedentes en la Universidad del Norte.....	15
3. Planteamiento del problema .....	17
4. Objetivos .....	17
4.1. Objetivo General .....	17
4.2. Objetivos Específicos .....	17
5. Marco Teórico .....	18
5.1. La contaminación .....	18
5.2. El calentamiento global .....	19
5.3. La Región Caribe colombiana .....	20
5.4. Las microalgas .....	21
5.4.1. Cultivo de microalgas .....	23
5.4.2. Productos .....	26
5.4.3. Procesamiento .....	28
6. Estado del arte .....	31
6.1. Tendencias de los investigadores .....	33
6.2. Problemas a los que se han enfrentado los investigadores .....	35
7. Marco conceptual .....	37
8. Metodología .....	41
8.1. Planificación .....	42
8.2. Diseño experimental .....	45
8.2.1. Factores potenciales de diseño .....	47
8.2.2. Factores perturbadores .....	48
8.2.3. Variable de respuesta .....	49
8.2.4. Estrategia de experimentación .....	49
9. Cronograma de experimentación .....	51
10. Rangos de composición del material ensayado .....	52

10.1.	Medio de nutrición .....	52
10.2.	Biomasa algal .....	53
10.3.	Hidróxido de sodio y otros aditivos .....	53
10.4.	Rango de concentraciones .....	53
11.	Resultados experimentales .....	54
11.1.	Experimento de tamizado .....	54
11.2.	Primer análisis experimental .....	56
11.3.	Experimento de optimización .....	60
11.4.	Segundo análisis experimental .....	62
12.	Discusión de resultados .....	64
13.	Conclusiones .....	67
14.	Futuras líneas de investigación .....	68
	Referencias .....	69
	Apéndice .....	76

## Lista de figuras

Figura 1. Vista de la ciénaga de Luruaco .....	16
Figura 2. Fotobiorreactores .....	24
Figura 3. Reactor abierto, tipo carrusel .....	25
Figura 4. Reactor abierto, tipo cascada .....	26
Figura 5. Biorreactores .....	29
Figura 6. Fotobiorreactor de agitación mecánica .....	34
Figura 7. Cultivo de cepa de <i>Chlorella</i> sp. ....	42
Figura 8. Montaje experimental: beakers en los agitadores magnéticos .....	43
Figura 9. Montaje experimental: probetas ya cargadas y beakers .....	44
Figura 10. Espectrofotómetro Genesys 30, Thermo Fisher Scientific .....	44
Figura 11. Montaje experimental: beakers en proceso de electrofloculación .....	45
Figura 12. Curvas de efectividad másica constante, sin adición .....	58
Figura 13. Curvas de efectividad másica constante, sin adición de cepa .....	59
Figura 14. Curvas de efectividad másica constante, con todas las adiciones ....	59
Figura 15. Curvas de efectividad másica constante, sin adición de floculante ...	60
Figura 16. Gráfica de los efectos principales .....	63
Figura 17. Diagrama de Pareto de los efectos principales .....	63
Figura 18. Gráfica de deseabilidad de los efectos principales .....	64
Apéndice	
Figura a. Probabilidad normal de residuales del primer experimento .....	76
Figura b. Probabilidad normal de los efectos del primer experimento .....	76
Figura c. Probabilidad normal de residuales del segundo experimento .....	77

## Lista de tablas

Tabla 1. Rendimiento anual y área requerida para sustituir la demanda de combustibles .....	27
Tabla 2. Factores potenciales de diseño y perturbadores del experimento .....	47
Tabla 3. Clasificación de los factores controlables .....	48
Tabla 4. Clasificación de los factores No controlables .....	48
Tabla 5. Diseño aleatorizado para la ejecución del experimento $2^4$ .....	50
Tabla 6. Diseño aleatorizado para la ejecución del experimento $3^2$ .....	51
Tabla 7. Composición del medio Arnon .....	52
Tabla 8. Composición de una probeta típica de cultivo luego del ensayo .....	54
Tabla 9. Resultados medidos del primer experimento ( $2^4$ ) .....	55
Tabla 10. Resultados calculados del primer experimento ( $2^4$ ) .....	56
Tabla 11. Cálculo de contrastes, efectos y suma de cuadrados (SS) .....	57
Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) del primer experimento ( $2^4$ ) .....	57
Tabla 13. Resultados medidos del segundo experimento ( $3^2$ ) .....	61
Tabla 14. Resultados calculados del segundo experimento ( $3^2$ ) .....	61
Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) del segundo experimento ( $3^2$ ) .....	62



## Resumen

Esta investigación consiguió determinar una alternativa de floculación de microalgas, comunes en el Caribe colombiano, que no altera ni la vitalidad de las células, ni la composición química de su biomasa, minimiza la energía requerida para la remoción de agua durante la cosecha y permite emplear la biomasa en diferentes aplicaciones.

Se adelantó una metodología en tres etapas: una no experimental, una experimental de tamizado y la última, experimental de optimización. Se probaron, en una cepa de *Chlorella* sp. recogida en aguas de la Región Caribe colombiana, cinco de los métodos más usados por los investigadores para promover la floculación de las algas: electrofloculación, adición de hidróxido de sodio, adición de otra cepa de alga, adición de floculante y adición de coagulante.

La primera de las técnicas intentadas, la electrofloculación, se descartó desde la etapa no experimental por los bajos resultados obtenidos con la cepa de interés; las otras cuatro se probaron en la primera etapa experimental y se encontró un efecto más importante en dos de ellas: la adición de hidróxido de sodio y la de coagulante. Estas dos fueron probadas durante la segunda etapa experimental.

Se apreció que, para la cepa probada, la adición de pequeñas concentraciones (alrededor de 1,2 mg por litro de cultivo) del coagulante permitió alcanzar efectividades másicas de cerca de 32 (el volumen de cultivo a tratar para un secado adicional se reduce a menos de la treintava parte). Los otros métodos empleados alcanzaron, por si solos, efectividades másicas máximas de 1,2 para la adición de hidróxido de sodio; 1,03 para la adición de la cepa *Scenedesmus almeriensis* y 1,06 para la adición del floculante Actipol.

Aún cuando todas las pruebas realizadas siguieron un protocolo idéntico y, por consiguiente, dieron lugar a consumos de energía idénticos; al considerar los distintos consumos energéticos requeridos para la obtención de biomasa, se puede afirmar que las que generaron mayores efectividades másicas (más biomasa concentrada en volúmenes menores) demandarán menos energía en los tratamientos posteriores a la floculación; por lo que se concluyó que el tratamiento

más económico resultó ser la adición de coagulante; permitió concentrar la mayoría de la biomasa en un volumen de cerca de un treintavo del original.

## Introducción

El ser humano ha logrado grandes desarrollos económicos y tecnológicos, utilizando muchos de los recursos disponibles en la Tierra. Sus acciones, como las de los demás habitantes del planeta, dejan huellas; pero, dado su enorme crecimiento, requiere cada vez mayor cantidad de recursos y genera aún más residuos. Al igual que muchas otras disciplinas, la ingeniería mecánica busca alternativas que permitan reducir las consecuencias de la contaminación, particularmente la generada por la maquinaria y las tecnologías con que habitualmente trabaja. En ese afán, la biología aparece como una fuente de inspiración porque, a diferencia de lo que ocurre con las operaciones humanas, los demás seres vivos se muestran siempre capaces de convertir en recursos lo desechado por otros. Particularmente las microalgas parecen proporcionar una excelente alternativa ya que en la naturaleza cumplen una doble función: absorben dióxido de carbono y generan valiosas sustancias que aprovechan otras especies. En los últimos años se ha encontrado que esas sustancias pueden utilizarse en diferentes productos como biocombustibles, alimentos y especialidades farmacéuticas; cabe anotar que una de las mayores fuentes de contaminación del planeta es, precisamente, la quema de combustibles fósiles, así que su remplazo con biocombustibles puede jugar un papel importante en la reducción de contaminación.

Las microalgas se encuentran de forma natural en casi todos los cuerpos de agua, pero se han desarrollado formas de cultivo en busca de maximizar sus beneficios. Uno de los inconvenientes que se presentan es que se cultivan en grandes volúmenes de agua y para su posterior uso en la industria se requiere retirarlas de este medio; esto demanda grandes cantidades de energía, con lo cual se perdería uno de los principales objetivos de su utilización: reducir la contaminación ocasionada por la quema de combustibles en la generación de energía.

Esta investigación se adelantó para seleccionar una alternativa viable que facilite la extracción de la biomasa presente en el medio cosechado de cultivos de microalgas. Se centró en la especie *Chlorella sp.* por su ubicuidad en la Región

Caribe colombiana, su resistencia a las condiciones climáticas y la amplia gama de posibilidades de uso industrial de la biomasa que genera. Los contenidos típicos de sólidos en el agua de cultivo oscilan entre 0,2 y 0,8 g/l para los estanques abiertos y hasta 5 g/l en fotobiorreactores (Vandamme, 2013); estos valores, apropiados para el crecimiento de los microorganismos, resultan inadecuados al momento de emplear la biomasa cultivada en aplicaciones posteriores como la producción de combustibles o de alimentos. En vista de los altos costos energéticos asociados a separar el agua antes del procesamiento posterior, se decidió explorar una alternativa que permita reducir la energía necesaria para el secado, de forma que aumente el atractivo del empleo de esta microalga para cualquiera de las posibilidades tecnológicas de aprovechamiento.

## 1. Justificación

El crecimiento demográfico, el agotamiento de los recursos energéticos y el calentamiento global son tres retos que se conjugan actualmente y que han dado lugar a la proliferación de propuestas tendientes a resolver la encrucijada que ellos plantean en un mundo que, legítimamente, busca mejorar sus condiciones de vida. El aumento poblacional impulsa la demanda por los insumos necesarios para la vida humana; entre estos recursos, los combustibles ocupan un lugar importante, pero su excesivo empleo ha conducido a la reducción de su disponibilidad y, en opinión de un número cada vez mayor de expertos (Chisti, 2007), al incremento de la concentración atmosférica de gases que exacerban el efecto invernadero dando lugar al calentamiento global.

La producción de biocombustibles resulta una alternativa interesante porque colabora en la solución de los dos últimos retos citados y, en apariencia, también a algunas de las consecuencias del primero pues permiten una producción sostenida de combustibles a partir del dióxido de carbono presente en la atmósfera (reduciendo así el efecto invernadero); sin embargo, la competencia entre los recursos necesarios para producirlos y aquellos requeridos para la alimentación humana ha conducido a descartar las opciones más obvias para su fabricación: las cosechas tradicionales y los residuos de las mismas. En vista de lo anterior, el empleo de especies no “tradicionales”, como las microalgas, se torna una alternativa más apetecible: las microalgas no demandan terrenos fértiles para su cultivo y se pueden adaptar a muy distintas calidades de agua (dulce, salada o salobre, lo mismo que limpia o residual) (Darzins, 2010), al tiempo que resultan muy convenientes para la absorción del dióxido de carbono liberado por los procesos de quema de combustibles.

En consonancia con lo dicho, durante las últimas décadas se han adelantado numerosas investigaciones que procuran desarrollar el cultivo de microalgas, más allá de su empleo en la producción de especialidades farmacéuticas y nutricionales. Sin embargo, este esfuerzo no se ha traducido aún en una producción significativa de biocombustibles o de alimentos de uso común. Este fenómeno se debe, en parte, a los altos costos energéticos asociados al cultivo de las microalgas (Darzins, 2010):

ya que éstas dependen de la luz para su crecimiento, la concentración a la que pueden mantenerse en el cultivo no puede ser excesiva para que no se hagan sombra las unas a las otras. Por lo tanto, las concentraciones de biomasa habituales son de unos 0,5g/l en los estanques abiertos y de hasta 5g/l en los fotobiorreactores (Vandamme, 2013). Al momento de procesar la biomasa cultivada, se deben gastar ingentes cantidades de energía en separar las microalgas del agua (Vandamme, 2013); si la densidad es de 5 gramos de microalga por litro y evaporar un litro de agua demanda cerca de 2256,5 kJ, la obtención de un kilogramo de alga seca (por secado) exigiría unos 56500 kJ. Los costos asociados a la separación hacen que no resulte rentable su empleo en la producción de sustitutos para elementos con bajos precios en el mercado como los combustibles (Pardo-Cárdenas, 2013; Acién, 2013; Chisti, 2007) o los alimentos tradicionales.

En los últimos años, se ha llegado a la conclusión de que la forma más eficaz para reducir los costos energéticos asociados a la separación de las microalgas es el empleo de procedimientos como la floculación que reducen la tendencia natural de casi todos estos microorganismos autótrofos: mantenerse separados para maximizar su área de ganancia de luz (Vandamme, 2013); la floculación permite, al aglomerar las células, decantarlas del grueso del volumen de agua y, gracias a que aumenta el tamaño de las unidades separadas, reduce la energía a emplear para concentrar más el caldo resultante (Vandamme, 2015; Alam, 2014; Salim, 2013). Hasta el momento se han investigado varias alternativas de floculación pero aún no parece haberse hallado una opción completamente satisfactoria que permita obtener biomasa seca con un consumo energético inferior al que se pueda extraer de ella; posibilitando su empleo para aplicaciones de bajo costo comercial como la producción de combustibles.

Esta investigación se orientó a encontrar una alternativa para la floculación de microalgas cultivadas que no impidiese y pudiera reducir la energía necesaria para su procesamiento cualquiera que éste sea; es decir, alterando en mínimo grado su vitalidad y la composición química de la biomasa y permitiendo que los microorganismos puedan emplearse tanto para aplicaciones de muy alto valor agregado (como la producción de complementos alimenticios y farmacéuticos),

cuanto para aplicaciones de mucho menor precio en el mercado (biocombustibles), pasando por la alimentación de peces, crustáceos y moluscos. Se espera que, de esta forma, contribuya a la masificación del cultivo de microalgas y, con ello, a la satisfacción de las necesidades humanas ante las tres circunstancias previamente enunciadas: crecimiento demográfico, escasez de recursos energéticos y calentamiento global.

La Región Caribe colombiana parece especialmente apropiada para adelantar este cultivo por sus condiciones climáticas, económicas y sociales. En cuanto a las primeras, la estabilidad de la temperatura ambiente (que reduce la necesidad de controlar la temperatura de los reactores), y la abundante y casi permanente radiación solar (que disminuye la necesidad de invertir energía en iluminación) permiten esperar bajos costos energéticos de cultivo. Con relación a las condiciones económicas, las mayores centrales térmicas del país y varios hornos de procesamiento mineral se encuentran emplazados en la región; de forma que hay empresas con grandes emisiones de CO<sub>2</sub> que, eventualmente, podrían interesarse en mitigarlas; esto permitiría encontrar ubicaciones convenientes para el cultivo con un suministro energéticamente económico de dióxido de carbono. En lo que respecta a las condiciones sociales, la Región Caribe colombiana cuenta con facultades de microbiología; biología; ingenierías química, mecánica, industrial y agroindustrial; lo mismo que escuelas técnicas en muchos de los ramos en capacidad de formar el recurso humano que podrían necesitarse para el cultivo de microalgas.

## 2. Antecedentes en la Universidad del Norte

En el año 2006, Pupo (2013) emprendió la optimización del diseño de un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas en la Universidad del Norte, este proyecto constituyó su tesis de maestría en ingeniería mecánica y en él trabajó hasta el año 2010; de manera casi simultánea, García desarrolló la modelación del flujo de burbujas de aire en el mismo equipo (Pupo, 2013). Los trabajos de Pupo y García se adelantaron con una cepa de *Nannochloropsis* sp. suministrada por

Ceniacua. La anterior información sirvió de base para que se iniciara el cultivo de microalgas en los laboratorios de la institución; primero se trabajó con cepas de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* facilitadas por otros laboratorios, como el laboratorio de biotecnología de la Universidad de los Andes que aportó una cepa de *Chlorella vulgaris*. Pero, luego de obtener la Universidad del Norte el permiso para la captura de especímenes silvestres, en 2013, se procedió a la recolección en cuerpos de agua del departamento del Atlántico; para lo que se seleccionaron la ciénaga de Luruaco (ver siguiente figura) y el río Magdalena, como cuerpos léntico y lótico, respectivamente, representativos del departamento.



Figura 1. Vista de la ciénaga de Luruaco, área de captura de microalgas. Elaboración propia

Con las algas recogidas se adelantó primero la separación de cepas, y con ellas se hicieron pruebas de absorción de  $\text{CO}_2$  y de tratamiento de aguas contaminadas con alquitranes y con herbicidas; estas pruebas permitieron el crecimiento en fotobiorreactor de cultivos de algas que, respectivamente, fueron agitados con una mezcla de aire y gases de combustión, tuvieron el alquitrán como complemento del medio de cultivo y experimentaron adiciones de clorpirifos en diferentes concentraciones. El  $\text{CO}_2$  y los alquitranes provenían de otras investigaciones adelantadas en la Universidad, relacionadas con la gasificación de residuos agrícolas para la producción de energía eléctrica, en este último proyecto trabajaron Mendoza (2015) y Verdeza (2015).

Otras investigaciones sobre este mismo tema incluyen el empleo de excedentes agrícolas para la alimentación de microalgas como sustituto de medios estándar,



liderada por Aldana (2017) y la simulación del comportamiento de un fotobiorreactor considerando en él la presencia del medio líquido, el gas de agitación y las microalgas (medio sólido), por parte de Calvo y sus colaboradores (2017).

### 3. Planteamiento del problema

¿Existe una alternativa de floculación de microalgas, aplicable a las especies existentes en el Caribe colombiano, que no altere la vitalidad de las células ni la composición química de su biomasa, de forma que se minimice la energía requerida para el procesamiento de la cosecha en cualquier aplicación que se desee hacer de ellas?

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo general

Determinar una alternativa de floculación de microalgas, comunes en el Caribe colombiano, que no altere ni la vitalidad de las células, ni la composición química de su biomasa, de manera que se minimice la energía requerida para la remoción de agua durante la cosecha y la biomasa pueda emplearse en diferentes aplicaciones.

#### 4.2. Objetivos específicos

- Establecer el grado de efectividad de distintos sistemas de floculación; como la electrofloculación, la biofloculación, la alteración del pH, la adición de coagulantes y de floculantes.
- Definir cuál de los métodos es el que afecta menos la vitalidad de las células y la composición de la biomasa.
- Especificar cuál método consigue, en condiciones de laboratorio, separar del agua de cultivo un mayor porcentaje de la masa de microalgas, en un volumen menor y con el menor gasto de energía.
- Seleccionar el método más adecuado para el Caribe colombiano, de acuerdo con los resultados obtenidos en laboratorio.

## 5. Marco teórico

### 5.1. La contaminación

Siempre que una sustancia abandona su medio natural y se desplaza hacia otro que le es ajeno, podemos hablar de contaminación; de alteración de un medio por una sustancia extraña. La contaminación puede originarse por causas naturales como la ocasionada por el vulcanismo, los incendios forestales,..., o por la actividad humana, en cuyo caso se denomina antrópica.

Es bueno recordar que, para poder sostener sus actividades vitales, los seres vivos contaminan permanentemente distintos medios; tanto con su simple presencia, como con los desechos generados por su actividad. En términos generales, los organismos vivos han ajustado sus procesos vitales de manera que los desechos de uno se convierten en recursos para otro; de forma que se reduzcan tanto el volumen de material contaminante como el esfuerzo por conseguir recursos frescos.

Ahora bien, cuando por causas naturales o antrópicas aumentan exageradamente los niveles de una sustancia extraña en un medio, éste se desbalancea y alcanza una condición diferente a la original de forma más o menos permanente. Entre los fenómenos de corta duración ocasionados por estos procesos, encontramos la denominada eutrofización (o eutrofización), que no es otra cosa sino el incremento desmedido de la población de microorganismos autótrofos en un cuerpo de agua, en respuesta a un incremento anormal de las sustancias que emplean para su metabolismo. Como muchos de estos autótrofos son también fotosintéticos, se desplazan a la superficie del agua para aumentar su acceso a la luz solar y, con ello, aprovechar los nutrientes; como consecuencia, privan a la parte inferior del estanque de luz y del oxígeno que la fotosíntesis libera, con lo cual originan la mortandad de los seres aeróbicos que pueblan el estanque (Moreno Franco, 2010).

En cuanto a los de larga duración, podemos mencionar el agotamiento de la capa de ozono, la reducción de la visibilidad atmosférica, la contaminación transoceánica y el calentamiento global. Estos fenómenos pueden dar lugar a

alteraciones con duraciones que oscilan entre meses y décadas, y que pueden tener efectos nocivos sobre las actividades humanas. Por su gran trascendencia y la relación que guarda con esta investigación, se resalta este último.

## 5.2. El calentamiento global

La atmósfera ejerce una influencia considerable en el clima de la Tierra, no sólo por el viento y los demás meteoros relacionados con él; la atmósfera opera como un modulador de la temperatura a la cual el planeta disipa el calor proveniente del Sol. A esta modulación se le denomina efecto invernadero que, según Corominas (2014), se presenta cuando la luz solar llega a la Tierra y se dispersa en la atmósfera y se refleja en las nubes; este proceso, al igual que sucede en un invernadero artificial, hace que la Tierra libere el calor a una temperatura más alta de la que alcanzaría sin atmósfera. Ahora bien, este efecto se debe principalmente a gases como el vapor de agua y el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), y a la presencia de material particulado (sólidos o líquidos en forma de pequeñas partículas que permanecen largo tiempo suspendidas en la atmósfera); de forma que, al alterarse las cantidades de estas sustancias en la atmósfera, se altera también su capacidad de retener la energía aportada por la luz solar y se modifica la temperatura media de la superficie terrestre. Es de especial interés el reciente aumento en la temperatura del planeta al que se ha denominado calentamiento global.

La preocupación por el calentamiento global viene de años atrás y hay dos tendencias: quienes consideran que efectivamente es una realidad ocasionada por la acción humana y quienes piensan que existe causado por fenómenos naturales. Dentro de la primera tendencia, Dyson (2008: p.85 y 92) se refiere al clásico gráfico Keeling desarrollado con datos tomados en Hawai desde 1958 y durante 47 años por un profesor estadounidense del mismo nombre; el gráfico muestra: “un aumento sostenido en la concentración de dióxido de carbono con el paso del tiempo, desde 315 partes por millón en 1958 hasta llegar a 385 partes por millón en 2008”; agrega que con el gráfico se muestra que “cada molécula de dióxido de carbono presente en la atmósfera tarda alrededor de doce años en incorporarse a una planta”.

Igualmente Dyson (2008) comenta que Nordhaus considera que algunas propuestas planteadas para frenar el calentamiento global fueron demasiado ambiciosas, lo que implica altos costos y que sería mejor continuar trabajando en tecnologías de bajo costo que no afecten el crecimiento económico general. Precisamente, al parecer, plantear metas muy ambiciosas y panoramas catastróficos fue lo que dio lugar a la aparición de un tercer grupo de personas: quienes consideran que no hay calentamiento global o, al menos, no generado por la acción humana. El punto es que se prevé que la temperatura del planeta puede subir hasta cinco grados Celsius en unas décadas si no se reduce la contaminación.

De otra parte, las actividades humanas que podrían estar más relacionadas con el incremento en las emisiones de CO<sub>2</sub> y otros gases que estimulan el efecto invernadero son tan ubicuas y necesarias como el uso de motores de combustión interna (empleados principalmente en los equipos de transporte); la generación eléctrica, la calefacción doméstica y la producción de vapor (para industrias de todo tipo) con carbón, gas natural o cualquier otro combustible fósil; y la ganadería. Desde hace varios años se exploran alternativas para las mismas, pero es tal el volumen de las aplicaciones presentes que aún si existiera consenso sobre la importancia de hacerlo, se requerirían varias décadas para lograrlo. Entre otras cosas, por el tremendo impacto económico de la sustitución.

### 5.3. La Región Caribe colombiana

Esta región de Colombia se caracteriza por su relieve primordialmente plano (Aguilera, 2013) y su clima tropical cálido, con numerosas horas de insolación anuales. Representa el 11,6% de la superficie nacional, alberga el 21,4% de la población colombiana y, en 2010, generó el 15,1% del PIB del país (Aguilera, 2013).

Por su relieve característico, la Región Caribe desarrolló la generación térmica como su principal fuente de energía eléctrica; aún ahora, cuando la interconexión eléctrica permite que la energía hidroeléctrica que se produce en las zonas montañosas se consuma en la mayor parte del país, las termoeléctricas de la Región Caribe generan cerca del 30% del total de la energía eléctrica de Colombia

y permiten mantener el suministro cuando la irregularidad de las lluvias disminuye la capacidad hidroeléctrica.

Esta variación entre el uso primordial de fuentes hídricas y el de fuentes térmicas en la generación eléctrica es responsable de que la emisión de dióxido de carbono por este concepto oscile entre 130 gramos de CO<sub>2</sub> por cada kW.h (promedio de 2008 a 2013) y los 400 g<sub>CO2</sub>/kW.h que se alcanzan en períodos de sequía, fenómeno de El Niño, o los 50 g<sub>CO2</sub>/kW.h en los períodos de muy alta precipitación, Fenómeno de la Niña (Camargo, 2013). Estos números resultan más significativos cuando se considera que, en 2015, la demanda de energía eléctrica en Colombia fue de 66.548,5 GW.h (López, 2018), por lo que la emisión total, sólo por concepto de generación eléctrica, debió ser próxima a 8.650.000 toneladas de dióxido de carbono durante ese año.

Específicamente en Barranquilla, el inventario de emisiones adelantado en 2013 por el Centro de Investigaciones y Proyectos (Cinpro) de la Corporación Universitaria del Litoral, a partir de datos del año 2010, concluyó que la ciudad liberó a la atmósfera 3.023.552 toneladas de dióxido de carbono equivalente en el año; un número que incluye, además de la generación eléctrica, otras fuentes industriales, comerciales y residenciales (Velásquez-Lozano, 2018). A estas cifras, deberían añadirse las emisiones liberadas por el transporte en casi todas sus modalidades pues aún la penetración de vehículos eléctricos es muy pequeña tanto en la ciudad como en la región.

Desde el punto de vista económico, el Caribe colombiano históricamente ha tenido un rezago con respecto a otras zonas del país; esto lo señalan varios autores como Guerra (2007; en Tapias, 2017). El índice de calidad de vida en la Región Caribe es de 59.08, inferior al promedio nacional de 62.88 (Tapias-Ortega, 2017). Sin embargo, el índice de Necesidades Básicas Insatisfechas descendió en la región, excepto en la Guajira; entre 1993 y 2005 pasó de 51.3% a 45.4%. Para 2015 se registraba en la región un alto porcentaje de empleo informal: 84.5%. En 2016 el PIB per cápita fue 55.8% menor que el de Bogotá; de hecho, en el período de 1996 a 2016, la tasa de crecimiento del PIB per cápita de la región fue inferior a la nacional: 2.7% frente a 3%. La minería (principalmente de carbón y ferroníquel), la

construcción, la industria, y los servicios de salud y educación son las actividades que mayor participación porcentual alcanzan en el PIB de la región. La actividad industrial se concentra especialmente alrededor de Barranquilla y Cartagena, donde hay puertos y son los centros urbanos de mayor población de la zona (Aguilera, 2017). En general se observan varios indicadores de mejoría de la economía de la región pero aún por debajo de otras del país y con desigualdades entre centros urbanos y rurales.

En cuanto al talento humano, la Región Caribe tenía, en el año 2013, una cobertura del 32,8% en educación superior; una cifra que se disgrega en valores que van desde el 50,9% en el departamento del Atlántico, hasta el 19,5% en la Guajira (Melo-Becerra, 2016). La región cuenta con una buena oferta de universidades, tanto públicas como privadas, ubicadas principalmente en sus capitales; hay facultades de biología, microbiología, agronomía, acuicultura y demás carreras relacionadas con las ciencias biológicas, lo mismo que facultades de ingenierías agronómica, de alimentos, civil, eléctrica, electrónica, mecánica, química,... y de carreras tradicionales como medicina, derecho,... También cuenta con programas a nivel técnico y tecnológico en temas agropecuarios, agroindustriales e industriales.

#### 5.4. Las microalgas

Las algas son organismos del reino protista (no son ni hongos, ni plantas, ni animales; aunque algunas bacterias han sido clasificadas como algas) que cuentan con la capacidad de aprovechar la luz solar para generar compuestos orgánicos, partiendo del agua y del dióxido de carbono (Barsanti, 2006); por consiguiente, al igual que las plantas y algunos otros organismos, las algas están en capacidad de mitigar el calentamiento global al absorber el dióxido de carbono atmosférico al tiempo que liberan oxígeno molecular. De hecho, dado el medio acuático en que sobreviven la mayor parte de las especies de algas, es muy probable que hayan sido organismos de este tipo los primeros en generar oxígeno molecular para la atmósfera terrestre (Demirbas, 2010).

Estos organismos exhiben una fuerte variación en sus características morfológicas: su tamaño oscila desde el microscópico (desde 0,2 a 2,0  $\mu\text{m}$  el picoplankton) hasta las varias decenas de metros de altura que puede alcanzar las algas laminariales conocidas como kelp; su coloración varía desde distintos tonalidades de verde hasta rojo, pasando por colores pardos; también difieren en los hábitats en que crecen, en aspectos de su estructura interna y en los compuestos que producen para el almacenamiento de energía. Estas variaciones son reflejo de su carácter polifilético (individuos con orígenes genéticos diversos) (Barsanti, 2006) y justifican la diversidad de aplicaciones que para ellas ha encontrado el ser humano.

Las microalgas son tal vez el grupo más abundante de miembros de las algas; se encuentran en prácticamente todos los cuerpos de agua y constituyen la base de muchos de los ecosistemas en ellos, pues el oxígeno que liberan permite la respiración de los organismos aeróbicos que los habitan. Las microalgas son también fuente de alimento para muchos de estos organismos; desde rotíferos hasta alevinos, pasando por moluscos y crustáceos (sin olvidar grandes comedores de plancton como las ballenas y algunos tiburones) y, en todos los casos, constituyen la base de las cadenas alimenticias presentes en los medios acuáticos.

Por su gran variedad genética y la diversidad de hábitats que colonizan, las microalgas almacenan la energía química que fotosintetizan en una amplio número de compuestos orgánicos; muchos de ellos constituyen verdaderas “especialidades” químicas que son aprovechadas por un sinnúmero de otros organismos, como los salmones del Atlántico (*Salmo salar*) o los flamencos (*Phoenicopterus roesus*), que deben su color a la astaxantina procesada por las microalgas de las que se alimentan (Darzins, 2010).

#### 5.4.1. Cultivo de microalgas

Los primeros intentos de cultivar microalgas se desarrollaron en el siglo XIX en Europa; fueron principalmente realizados con fines de investigación de estos organismos (Mata, 2009). Durante la segunda guerra mundial, científicos alemanes

concibieron estanques abiertos para la producción de complementos alimenticios (Ugwu, 2008; Preisig, 2005). Poco después, algunos grupos de investigadores estudiaron el cultivo como una forma de aumentar las fuentes para la alimentación humana, en el instituto Carnegie en los Estados Unidos (Burlew, 1953).

Existen dos diseños básicos para la producción en tierra de microorganismos fotoautotróficos: los sistemas abiertos, en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera, y los sistemas cerrados (como los que se muestran en la Figura 2), comúnmente llamados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera (Markou, 2014). La mayoría de los sistemas de producción industrial de biomasa de microalgas construidos antes de los años 90 fueron esencialmente sistemas abiertos tipo carrusel, que permiten alcanzar densidades celulares de hasta 0,7 gramos de células (base seca) por litro (Lemmens, 2009).



Figura 2. Fotobiorreactores: continuo horizontal de espiras, izquierda; verticales, derecha. Laboratorio experimental, Universidad de Almería. Elaboración propia.

Los sistemas abiertos consisten en estanques poco profundos (nivel de agua de 15 a 20 cm); algunos de ellos constituyen circuitos cerrado, en los que se impulsa al medio de cultivo mediante agitadores rotatorios de paletas. En general, su construcción requiere grandes áreas de terreno (500-5000 m<sup>2</sup>), pero tienen como ventaja el bajo costo de producción de biomasa algal (Sazdanoff, 2006) en algunas zonas geográficas específicas. Las principales desventajas de este tipo de reactores son la posibilidad de contaminación y la falta de control sobre las condiciones de operación (Bilad, 2014); esta contaminación, además de distintas sustancias orgánicas o inorgánicas, puede incluir insectos o anfibios que se



alimenten de las microalgas o del medio adicionado para su nutrición. La Figura 3, a continuación, muestra un reactor abierto tipo carrusel, a escala piloto, ubicado en el centro de investigación Las Palmerillas, en Almería.



Figura 3. Reactor abierto, tipo carrusel. Centro experimental Las Palmerillas, Cajamar y Universidad de Almería. Elaboración propia.

También se han investigado reactores híbridos, que combinan características de los sistemas abiertos y los cerrados (fotobiorreactores) (Molina, 2001). Entre estos reactores híbridos se encuentran montajes tipo cascada en los que se aprovecha una topografía inclinada para instalar una serie de estanques bajos o un plano inclinado con o sin estructuras de retención; el sistema demanda el bombeo permanente, hacia el extremo superior, del agua que alcanza la parte baja del montaje, pero reduce los costos relacionados con el control de temperatura (Rawat, 2013).

Otro desarrollo híbrido parte del empleo de un fotobiorreactor pequeño en el que se desarrollan las cepas a cultivar posteriormente en un reactor de sistema abierto; esta combinación permite desarrollar núcleos de población de la cepa deseada lo suficientemente grandes y libres de contaminación para que puedan superar la competencia de otros organismos durante su período de crecimiento y acumulación de aceite en reactores abiertos (Jacob-López, 2008; Shao, 2015).



Figura 4. Reactor abierto, tipo cascada. Laboratorio experimental, Universidad de Almería. Elaboración propia.

Los sistemas de cultivos pueden ser iluminados por luz artificial, luz solar o ambas. Los sistemas naturalmente iluminados (ocupan grandes áreas superficiales) incluyen estanques abiertos (open ponds), biorreactores de placas planas (flat-plate), de elevación neumática (airlift), tipo tubular horizontal/serpentín (Cañizares-Villanueva, 2003) y fotobiorreactores tubulares inclinados (Molina, 2001).

Es común que los fotobiorreactores a escala de laboratorio se iluminen artificialmente con lámparas fluorescentes u otro tipo de distribuidores de luz. Algunos de esos fotobiorreactores incluyen el tipo columna de burbujas (bubble column), columna de elevación neumática (airlift column), de tanque de mezclado (stirred-tank), tubular helicoidal (helical tubular), cónico (conical), toroide (torus) y tipo alga marina (seaweed) (Mata, 2009).

#### 5.4.2. Productos

En los Estados Unidos, los sistemas de estanques de algas se desarrollaron para el tratamiento de aguas. La biomasa recuperada era convertida en metano para ser aprovechada posteriormente como fuente de energía (Mata, 2009). Las algas han llamado también la atención debido a su potencial para producir sustancias químicas, y suplementos nutricionales y farmacéuticos útiles para animales y humanos que incluyen alimento para personas (Burlew, 1953), beta caroteno y astaxantina (Mata, 2009), lo mismo que alimento para peces (Borowitzka, 2013). Algunos estudios muestran su importancia en la fijación de dióxido de carbono (Jacob-López, 2008; Chiu, 2008; Usi, 1997) que permite reducir la emisión

final de CO<sub>2</sub> de muchos procesos que dependen de los combustibles fósiles como fuente de energía; otros investigadores se interesan en su capacidad de producción de hidrógeno (Das, 2001; Melis, 2002), una fuente de combustible que produce como desecho vapor de agua.

Adicionalmente, dada la inestabilidad del precio del petróleo a nivel mundial y, más aún, el alto número de contaminantes que el empleo de los combustibles fósiles libera al ambiente, se ha considerado a las microalgas como una materia prima de gran potencial para la producción de combustibles alternativos (Demirbas, 2010). Los componentes o productos de algas comúnmente estudiados para la producción de combustibles alternativos son: almidón o celulosa para producción de etanol, hidrógeno para celdas de combustibles, biomasa para combustión directa y lípidos para la producción de biodiesel (Mata, 2009; Chisti, 2007).

Los rendimientos alcanzados por las microalgas en la producción de aceite para obtener biodiesel parecen convertirla en la única solución que podría satisfacer las necesidades actuales de demanda de combustible. Una superficie de una hectárea, puede producir, al año, el equivalente a 136.900 litros de aceite con microalgas cuya biomasa seca contenga un 70% de aceite; un valor bastante alto, pues algunos autores hablan de contenidos próximos al 38% (San Pedro, 2013). En cambio, una hectárea de suelo fértil para cultivo de soja produciría 446 litros, para cultivo de maíz, 172 litros y para el cultivo de palma, 5.950 litros (ver tabla 1).

**Tabla 1. Rendimiento anual y área requerida para sustituir la demanda de combustibles. Datos tomados de Mata (2009).**

Cultivo	Producción de aceite (l/ha)	Área terrestre requerida (Mha)
Maíz	172	1.540
Soya	446	594
Canola	1.190	223
Jatropha	1.892	140
Coco	2.689	99
Palma de aceite	5.950	45
Microalgas	136.900	2

El suministro de CO<sub>2</sub> es un elemento vital para producir microalgas a gran escala. Un estanque de algas de 1.000 m<sup>2</sup> en Roswell, Nuevo México reporta un

consumo de cerca de 10.589 kg anuales de CO<sub>2</sub>. Esta es una masa minúscula si se considera que una planta de generación térmica de 785 MW produce 19.488 toneladas de CO<sub>2</sub> diariamente, lo suficiente para abastecer a 330.000 estanques de algas (Contreras-Flores, 2012), de manera que nuestra presente economía basada en la quema de combustibles fósiles genera un inmenso potencial para el crecimiento de microalgas. Por otro lado, la preocupación por el calentamiento global, da lugar a que la capacidad de absorber el dióxido de carbono por parte de estos microorganismos pueda constituir también un producto de interés para aquellas industrias que necesitan emitirlo para adelantar sus procesos (como la generación eléctrica a partir de fuentes térmicas).

#### 5.4.3. Procesamiento

La obtención de cualquiera de los productos mencionados implica cosechar la biomasa producida; desafortunadamente, la concentración de biomasa (microalgas) en un cultivo, sea éste abierto o cerrado, es muy baja: entre el 95% y el 99,5% del peso del cultivo lo constituye el agua (Vandamme, 2013; Samarasingue, 2015) y extraerla puede representar, según algunos, cerca del 84% del consumo energético de todo el procesamiento de las microalgas (Lardon, 2009), otros autores hablan de hasta el 92,7% (Rawat, 2013). A continuación se resume el modelo de costos energéticos propuesto por Sander y Murthy (Sander, 2010) para una unidad de producción funcional de 1.000 MJ:

$$ER_N = \frac{E_{iN}}{1.000MJ(de E_{fu})} , \quad E_{iN} = E_{iT} - E_{cA} , \quad E_N = 1.000MJ(de E_{fu}) - E_{iN}$$

En este modelo,  $ER_N$  representa la fracción energética neta (net energy ratio) que se obtiene al dividir el aporte neto de energía ( $E_{iN}$ ) entre la unidad funcional escogida (1.000 MJ) que se producirá en forma de biodiesel a partir del cultivo. El aporte neto de energía es la diferencia entre el aporte total de energía ( $E_{iT}$ ) y la energía disponible en los otros productos (coproduct allocation,  $E_{cA}$ ). En consecuencia, para la unidad funcional considerada, la energía neta obtenida será la diferencia entre los 1.000 MJ que debe aportar esa unidad y el aporte neto de energía que demandó su producción.

En general, los consumos de energía del cultivo de microalgas pueden dividirse entre los requeridos para el cultivo ( $E_{iC}$ ), los exigidos para la cosecha ( $E_{iH}$ ), los que demanda el secado ( $E_{iD}$ ) y los necesarios para el procesamiento ( $E_{iP}$ ) (Lardon, 2011).

$$E_{iT} = E_{iC} + E_{iH} + E_{iD} + E_{iP}$$

El primer elemento es el cultivo propiamente dicho, y depende de la tecnología que se emplee para su realización; desde el punto de vista de los costos directos asociados, lo más conveniente es el cultivo en estanques abiertos; pero tienen problemas con el control de temperatura y el alto riesgo de contaminación pues estos sistemas generalmente están abiertos a la atmósfera.

Además de los problemas previamente enunciados, la baja densidad celular que caracteriza estos cultivos origina varios inconvenientes, que incluyen baja productividad y costosa recuperación del producto a partir de medios diluidos. Estos inconvenientes estimularon el desarrollo de reactores contruidos con materiales transparentes como vidrio y policarbonato (fotobiorreactores), entre otros materiales (Cañizares-Villanueva, 2003); un campo en el que la Universidad del Norte ha adelantado una experiencia importante (Pupo, 2013). La Figura 5. muestra imágenes de un reactor abierto, a la izquierda, y uno cerrado, derecha.



Figura 5. Biorreactores: abierto, tipo carrusel (Finca las Palemerillas, Almería, España) y cerrado, tipo columna de burbujas (Universidad del Norte, Atlántico, Colombia).

Cualquiera que sea la forma de cultivo, el procesamiento de la biomasa obtenida implica, casi siempre, la remoción previa de entre 995 y 999,5 mililitros de agua por

cada litro cosechado; lo cual demandaría, para su evaporación, el empleo de entre 2.144 kJ y 2.255 kJ. Estos costos energéticos resultan excesivos para obtener una biomasa de menos de 5 g; así que se deben emplear otras técnicas si se desea obtener productos de bajo costo como los biocombustibles que, además, se comercializan en volúmenes tan grandes que permiten el cultivo masivo y, en consecuencia, absorber grandes cantidades de CO<sub>2</sub>.

La extracción de la humedad (secado) puede realizarse también por medios mecánicos (centrifugación o microfiltración); pero los costos energéticos asociados con estas alternativas son elevados si se comparan con el valor de los productos que se pueden obtener a partir de la biomasa (Vandamme, 2013; Rawat, 2013; O'Connell, 2013; Van den Hende, 2011). Hay alternativas mecánicas que pueden ayudar a la separación inicial del agua, como el filtrado en tambores rotatorios al vacío (Shao, 2015); sin embargo, resultan más convenientes para microalgas de tamaño considerable (San Pedro, 2013).

Los altos costos energéticos del secado (Lardon, 2009), especialmente considerables cuando se compara el precio en el mercado de algunos de los productos que la biomasa de algas podría sustituir (como el combustible Diesel), hacen pensar en la conveniencia de considerar el procesamiento como una biorrefinación, análoga al proceso de refinación de petróleo, en la que se obtengan múltiples productos con precios distintos y energías disponibles diferentes ( $E_{CA}$ ), donde los más costosos puedan subvencionar algunos de los más baratos en el mercado; este enfoque demanda el empleo de tecnologías que no alteren la integridad de los subsecuentes productos (Lardon, 2009).

Entre las opciones que se han evaluado para retirarle el agua a la biomasa del cultivo: secado, centrifugación, filtrado, floculación,..., la floculación resalta por los bajos costos energéticos que implica su aplicación con respecto a los otros métodos. Al agrandar el tamaño de los elementos a separar; la floculación puede reducir significativamente los costos de emplear técnicas más tradicionales como la filtración o el centrifugado (Vandamme, 2013).

#### 5.4.3.1. Floculación

Incluir la floculación en los procesos de separación, puede ser una alternativa importante pues permite aumentar las dimensiones de los cuerpos a filtrar o extraer por cualquier método (como la sedimentación); en este sentido han trabajado ya varios investigadores llegando a la conclusión de que constituye la alternativa más eficiente para aumentar la concentración del material cosechado (Vandamme, 2013), hasta niveles próximos al 5% (50 g/l) en sólidos cuando se parte de algas cultivadas en estanques abiertos (O'Connell, 2013), en general, hasta niveles entre 10 y 50 g/l (Vandamme, 2013). En su artículo de Análisis de Ciclo de Vida para la Producción de Biodiesel a partir de Microalgas, O'Connell y otros (2013) analizan un caso base en el que se emplean sulfato de aluminio y carbonato de calcio como agentes floculantes; considerándolos en capacidad de extraer el 95% de las algas y de incrementar la concentración de biomasa en el lodo desde el 0,5% hasta el 5%.

Para comprender la floculación hay que considerar que la membrana celular de las microalgas presenta numerosas moléculas con grupos funcionales que le confieren una carga eléctrica superficial negativa; esta carga eléctrica atrae iones de carga contraria presentes en el agua ( $H^+$ , por ejemplo) y da lugar a una carga superficial global positiva. Dado que lo mismo sucede con todas las células presentes, las mismas se repelen y permanecen aparte las unas de las otras (Vandamme, 2013). Cambiar esta tendencia natural en la mayoría de las microalgas demanda generar fuerzas capaces de oponerse a la repulsión electrostática; las mismas pueden actuar disminuyendo la diferencia de potencial entre la célula y el agua que la rodea, o dar lugar a puentes entre sectores específicos de las diferentes células.

Entre otros autores que hablan de floculación como primer paso en la concentración de microalgas, antes de su procesamiento posterior, tenemos a Vandamme (2013), Van den Hende (2011) y Gerardo (2015). El primero de ellos propone la siguiente clasificación para los métodos de floculación: neutralización de cargas, atracción electrostática en "parches", formación de puentes y floculación por barrido. Van den Hende enfatiza la necesidad de reducir los costos de cosecha para que las algas sean una alternativa eficaz en el tratamiento de aguas residuales y en

la absorción de dióxido de carbono. Gerardo, por su parte, compara la floculación con la centrifugación, y describe las ventajas y desventajas de cada procedimiento.

Dado que la repulsión y la atracción entre las células responde a fuerzas electrostáticas, algunos investigadores probaron con la generación de corrientes de iones metálicos, liberados por un ánodo eléctrico en el medio cosechado, para estimular la floculación de la biomasa (Vandamme, 2013). El principio ya había sido probado con anterioridad para la depuración de aguas por su eficiencia y la mínima generación de lodos (Moussa, 2017) y resulta especialmente promisorio cuando se emplea en agua salada (Vandamme, 2013).

Otra alternativa para la floculación es la biofloculación propuesta por Salim y Wijfels (2012): que aprovecha el hecho de que la conjugación de algunas especies favorece la floculación del consorcio resultante sin necesidad de añadir agentes externos. Esta alternativa puede resultar muy útil si no se desea matar la microalga durante el proceso o alterar la composición química de la biomasa recolectada (Vandamme, 2013); pues permite reducir en más de un 80% la energía necesaria en la posterior centrifugación (Salim, 2012).

## 6. Estado del arte

La conveniencia de emplear las microalgas como una forma de cerrar el ciclo del carbono en muchos procesos antrópicos parece estar fuera de toda discusión; son numerosas las investigaciones que se han adelantado en todo el mundo que confirman la alta capacidad de estos microorganismos para absorber y fijar el dióxido de carbono en sus tejidos (Usi, 1997). La gran diversidad de especies de microalgas también sustenta la confianza (cumplida en muchos casos) en que constituyan la fuente para un sinnúmero de especialidades nutricionales y farmacéuticas con alto valor comercial (Borowitzka, 2013).

Desde mediados del siglo XIX, numerosos investigadores han emprendido el estudio de las microalgas, inicialmente con fines puramente científicos (Preisig, 2005) y, posteriormente, con intereses más prácticos como la producción de lípidos para combustibles, sustancias antimicrobianas y diversas sustancias bioquímicas



(Fisher, 1953), también se ha estudiado su empleo en el tratamiento de aguas residuales (Pellón, 2003).

Cerca de dos siglos de experiencia en el cultivo de microalgas, sin considerar experiencias más empíricas adelantadas previamente (con fines alimenticios) por pueblos de Chad, Mongolia, China y Perú (Coral, 2003), han permitido desarrollar un importante acervo de conocimientos y tecnologías que, en líneas muy generales, se discuten a continuación.

### 6.1. Tendencias de los investigadores

Los primeros cultivos, formales, de microalgas de los que se tiene registro fueron desarrollados por Ferdinand Cohn en 1850; sin embargo, su cultivo del flagelado *Haematococcus* no fue aislado de otras especies de microorganismos, no contó con un medio de cultivo específico y no pudo sostenerse de manera indefinida (Preisig, 2005). Los investigadores que lo sucedieron, como Famintzin (1871), Beijerinck (1890), Klebs (1896), Miquel (1890 a 1898), Noll (1892), Oltmans (1892) y muchos otros, se dedicaron, durante la segunda mitad del siglo XIX, precisamente a superar esas limitaciones (Preisig, 2005).

Ya en el siglo XX, las guerras sirvieron de estímulo al desarrollo de aplicaciones más pragmáticas para las microalgas, como las previamente comentadas (Preisig, 2005); estos trabajos se enfrentaron a la necesidad de “sacar” los cultivos del laboratorio y llevarlos a un medio con condiciones más apropiadas para la producción masiva; los primeros cultivos de estas características se desarrollaron en estanques abiertos del tipo “pista de carreras” (Mata, 2009), (Preisig, 2005) en los que el agua del cultivo está impulsada permanentemente a recorrerlos. Los estanques abiertos fueron la tecnología preferida hasta finales del siglo XX; la biomasa producida se empleó inicialmente para fines alimenticios, luego se aprovecharon las microalgas para tratar aguas residuales y la biomasa se convirtió en metano combustible, más adelante se empezó a aprovechar la biomasa en la acuicultura (Mata, 2009).

Una nueva tendencia en el empleo de las microalgas: el desarrollo de especialidades farmacéuticas, comenzó a tomar fuerza a finales del siglo XX (aún

cuando se contemplaba desde principios del mismo siglo (Jorgensen, 1953) y, con ello, la preocupación por la pureza de los cultivos y el control de la contaminación con sustancias extrañas (Markou, 2014). Las anteriores preocupaciones (Molina, 2001) y el deseo de aumentar la densidad y productividad de los cultivos condujeron al desarrollo de los reactores cerrados, conocidos como fotobiorreactores (Coral, 2003).



Figura 6. Fotobiorreactor de agitación mecánica. Centro experimental Las Palmerillas, Cajamar y Universidad de Almería. Elaboración propia.

A principios del siglo XXI, impulsada por la creciente preocupación respecto al cambio climático, las algas comenzaron a considerarse como una opción viable para mitigar las emisiones de dióxido de carbono procedente de la combustión de hidrocarburos (FAO, 2009); particularmente al considerar su potencial para la producción de biocombustibles (Takeshita, 2011). Sin embargo, los bajos precios presentes de los combustibles fósiles, han constituido un reto considerable pues los costos de producción de combustibles a partir de microalgas aún se encuentran en niveles que no pueden competir con los primeros (Acién, 2012). Uno de los procedimientos que se han propuesto para superar estos inconvenientes es la reducción de los costos de cosecha de microalgas mediante la floculación (Vandamme, 2013).

Se ha experimentado con numerosas formas de floculación; entre ellas, la reducción del pH (Liu, 2013), adición de compuestos metálicos polivalentes, electrofloculación, adición de biopolímeros catiónicos, aumento del pH (Vandamme, 2013), adición de biofloculantes (Lananan, 2016), aplicación de rayos ultravioleta y recubrimiento con polietilamina (Agbakpe, 2014). Estas técnicas se han empleado

con diversas especies de microalgas con mayor o menor éxito; pero no se encuentran reportes de operaciones industriales de cultivo de microalgas para producciones diferentes a las de especialidades nutraceuticas y alimenticias para criaderos de peces y mariscos (FAO, 2009).

## 6.2. Problemas a los que se han enfrentado los investigadores

Los altos costos energéticos asociados a la cosecha de las microalgas (Darzins, 2010), (Chisti, 2007), (Sazdanoff, 2006) y los del procesamiento completo de las mismas (Khoo, 2011) han conducido a que, a pesar de todo los desarrollos anteriormente descritos, la producción industrial de derivados de las microalgas, hasta la actualidad, se haya centrado principalmente en la obtención de especialidades nutricionales y farmacéuticas (nutracéuticos) de uso humano (FAO, 2009), (Borowitzka, 2013) y, con algunas especies, en el cultivo de alimento vivo para alevinos, crustáceos y moluscos. Estas aplicaciones comparten el hecho de un elevado precio en el mercado (particularmente la primera) (FAO, 2009); adicionalmente, en el caso de la segunda, los animales que las ingieren están adaptados para hacerlo y el cultivo requiere poco tratamiento previo a su aprovechamiento.

Estas aplicaciones son de alta utilidad pero sólo alivian muy tangencialmente la demanda por hidrocarburos; por lo cual no son las más efectivas en atacar el agotamiento de las fuentes fósiles de estos combustibles y sólo parcialmente el calentamiento global. La producción de hidrocarburos a partir de microalgas, sin embargo, ha sido una alternativa aplicada en condiciones de altísima escasez como las que afrontaron los países del Eje durante la segunda guerra mundial (Fisher, 1953); por lo que no puede considerarse una opción completamente nueva. Sin embargo, dados los precios actuales de los combustibles derivados del petróleo, se requiere un considerable desarrollo tecnológico para que resulte comercialmente atractiva (Vandamme, 2013), (Takeshita, 2011), (De Godos, 2011).

Los principales inconvenientes encontrados para esta aplicación comercial son los costos de producción a partir de las microalgas; y, de estos costos, los rubros

que sobresalen son el cultivo de las algas y la extracción de la biomasa cosechada; Acien (2012) y sus colaboradores estimaron los parámetros económicos principales de la producción, en fotobiorreactores, de biomasa refrigerada de algas. En su análisis encontraron que el principal costo energético lo constituía el bombeo del agua de cultivo en el fotobiorreactor, 53,5%. El segundo costo en importancia fue el suministro de aire soplado al mismo fotobiorreactor, 21,4%; de manera que el cultivo implicaba cerca del 75% de la energía total consumida, mientras que la extracción de biomasa representó sólo el 7,4%.

Por su parte, Sander y sus colaboradores (2010) encontraron que, para algas cultivadas en reactores abierto, los costos energéticos de extracción pueden representar entre el 88% y el 94% de los costos totales de producir biodiesel, dependiendo de la forma de separación (filtrado o centrifugación). Esta investigación busca, precisamente, encontrar una forma más conveniente de adelantar la separación de una especie de microalga, común en la Región Caribe colombiana.

Ahora bien, son tantas y tan diversas las especies de microalgas que es necesario mucho esfuerzo investigativo para desarrollar procedimientos de cosechas que se apliquen a espectros amplios de especies y, en consecuencia, permitan su aplicación a los cultivos abiertos en los que resulta casi imposible preservar cultivos axónicos (de una sola especie); en efecto, durante el transcurso de esta investigación se pudo constatar que un cultivo experimental, adelantado a cielo abierto en el laboratorio de Las Palmerillas (ver figura 5) había pasado de ser dominado por una especie análoga a la *Chlorella* a exhibir una mayoría de *Scenedesmus almeriensis*, acompañado por diversos otros microorganismos (entre los cuales estaba la pseudoclorella y, por supuesto, larvas de insectos y muchos otros microorganismos más).

En el caso concreto de *Chlorella*, García-Pérez (2014) encontró que, en presencia de hidróxido de magnesio, los altos niveles de pH favorecían la floculación; mientras que Liu (2013) encontró, para especies como *Chlorococcum ellipsoideum*, *Chlorococcum nivale* y *Scenedesmus* sp., que la floculación se favorecía a bajos niveles de pH.

## 7. Marco conceptual

**Acuicultura:** Es la cría, levante y cosecha de plantas y animales en cualquier tipo de ambiente acuático, que incluye estanques, ríos, lagos y océanos. Incluye la producción de peces y mariscos que se crían para su venta en el mercado (NOAA), (Pankratz, 2000).

**Agua Residual:** También conocida como “agua servida”; la resolución 631 de 2015, del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2015), clasifica las aguas servidas en Domésticas y No Domésticas, según provengan de actividades residenciales o comerciales (las primeras), o de actividades industriales o comerciales siempre y cuando no resulten del aseo personal o del lavado no industrial de ropa.

**Alga:** Las algas constituyen un grupo diverso de organismos que abarca varias divisiones (entre ellas, las clorofitas, las rodofitas, las crisofitas,...) (Preisig, 2005). Comparten como característica el bajo nivel de especialización celular y que habitan, generalmente, en medios acuáticos. Las algas pueden ser unicelulares o estar agrupadas en colonias microscópicas o macroscópicas (Markou, 2014).

**BBM:** La sigla corresponde, en inglés, a Medio Basal de Bold; el BBM es una solución de sustancias minerales y orgánicas que proporciona los nutrientes requeridos por las algas (Andersen, 2005). El BBM se seleccionó para la alimentación de las cepas del laboratorio (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*), en la Universidad del Norte, tras ensayar con otros medios de cultivo.

**Biocombustible:** Sustancia combustible producida industrialmente a partir de seres vivos, primordialmente vegetales. De acuerdo con sus características químicas y físicas, los biocombustibles se clasifican generalmente en bioetanol y biodiesel; el primero se emplea como sustituto (total o parcial) de la gasolina, mientras que el segundo puede reemplazar al combustible Diesel (ACPM, en Colombia) (Ministerio de Hacienda y Crédito Público, 2017). Es de anotar que la leña es un biocombustible que ha sido empleado por el ser humano durante milenios.

**Calentamiento Global:** Alteración climática general en la Tierra, caracterizada por el aumento de la temperatura promedio de la superficie del planeta. De acuerdo con numerosa evidencia científica (Mann, 2014), (Cheremisinoff, 2002), el fenómeno actual de calentamiento global está asociado con el incremento de la concentración en la atmósfera de ciertos gases capaces de reflejar las radiaciones de alta longitud de onda (térmicas). Estos gases, denominados genéricamente como gases de efecto invernadero, son el resultado de procesos naturales y humanos; los últimos se relacionan principalmente con la combustión, siendo el dióxido de carbono el gas que se encuentra con mayor frecuencia y en mayor cantidad (Mann, 2014). La preocupación por las consecuencias negativas de este proceso de calentamiento ha llevado a la firma de una serie de compromisos entre casi todos los países del planeta para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero en procura de mantener el aumento de la temperatura global promedio por debajo de los 2 °C con respecto a niveles preindustriales.

**Densidad Óptica:** También denominada turbidez, es la disminución en la intensidad luminosa de un haz a determinada frecuencia, que ocasiona la presencia de contaminante en un medio “puro”. A nivel de laboratorio, en soluciones líquidas, se mide en un espectrofotómetro que emite haces luminosos, de diferentes frecuencias, que atraviesan una probeta transparente llena con la muestra cuya turbidez se desea determinar (Salim, 2012). La medición compara la intensidad emitida con la detectada por un sensor ubicado en el lado opuesto de la probeta.

**Dióxido de Carbono:** El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es un compuesto presente en pequeñas cantidades en la atmósfera terrestre actual (Isaza, 2009); se libera a partir de distintos fenómenos, tanto naturales como humanos. En cuanto a los fenómenos naturales, el vulcanismo constituye la principal fuente de su liberación a la atmósfera; la actividad humana tiene también una importante contribución en las emisiones totales de este gas a través de la combustión que genera muy buena parte de la energía eléctrica empleada y casi toda la energía térmica utilizada para calefacción y transporte. Por su capacidad de absorber y reflejar las radiaciones infrarrojas (radiaciones electromagnéticas de baja frecuencia y alta longitud de onda), el dióxido de carbono está en capacidad de contribuir al aumento de

temperatura de la superficie terrestre; y por los altos volúmenes que de él se emiten, se le considera el principal causante de las alteraciones significativas en el clima actual conocidas como calentamiento global (Cheremisinoff, 2002).

**Factor de Concentración:** Relación entre el volumen total y el volumen que ocupan los sedimentos (Grima, 2003) en un ensayo de sedimentación. Matemáticamente se puede expresar como:

$$FC = V_T/V_S$$

Cuando los ensayos se adelantan en un recipiente de sección constante, como una probeta, se puede simplificar el área y la expresión se reduce a:

$$FC = h_T/h_s$$

Esta expresión es más útil cuando se adelantan ensayos de jarras y otras pruebas de sedimentación.

**Floculación:** Fenómeno en el cual los elementos sólidos suspendidos en un medio fluido se aglomeran aumentando su volumen. Este fenómeno es un paso que permite formar partículas mayores cuya remoción, mediante filtración y asentamiento, resulta expedita. Se emplea para el tratamiento de aguas al liberarla de los sólidos presentes en ella. Para adelantarla pueden emplearse sustancias coagulantes (que desestabilizan las cargas en superficiales de los sólidos en suspensión) y floculantes (que estimulan la agregación de las partículas) (Tchobanoglous, 2003).

Puesto que las microalgas, generalmente, se encuentran suspendidas en un medio acuoso, la floculación es una alternativa viable para retirarlas del agua a bajo costo (Roselet, 2015). Como la suspensión de las microalgas la causa la presencia de cargas iónicas en su membrana celular, la floculación persigue desestabilizar dichas cargas y permitir así su aglomeración (Vandamme, 2013). La floculación de las microalgas puede adelantarse de varias formas: convencional (añadiendo agentes químicos que la promuevan), biofloculación (adición de pequeñas cantidades de otro microorganismo que faciliten la aglomeración de la especie de interés) y electrofloculación (desestabilizando las cargas superficiales mediante la acción de un campo eléctrico en el agua del cultivo).

**Fluorescencia de la clorofila:** Fenómeno mediante el cual los órganos fotosintetizadores emiten la porción de la energía luminosa que no fueron capaces de absorber ni disipar térmicamente; la determinación de esta fracción suministra información sobre el estado de estos órganos en el organismo que los posee y puede indicar la vitalidad de las algas pues muestra qué tan capaces son de realizar la fotosíntesis. Puede medirse mediante la relación  $F_v/F_m$ , eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) que indica el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria cuando todos los centros de reacción del PSII están oxidados o abiertos (González, 2008).

**Fotosíntesis:** Proceso mediante el cual un organismo vivo especialmente adaptado es capaz de producir cadenas de carbono complejas a partir del dióxido de carbono, el agua y la energía solar. Los organismos capaces de utilizar la fotosíntesis para generar su alimento se conocen como autótrofos (en oposición a los heterótrofos, que requieren ingerir cadenas orgánicas sintetizadas por otros seres vivos) (Demirbas, 2010).

**Fotobiorreactor:** Recipiente completa o casi completamente cerrado que se emplea para el cultivo de organismos fototróficos, en el cual la energía se suministra por medio de luces eléctricas (Behrens, 2005). Son equipos muy eficaces para la producción de biomasa (Pupo, 2013) pues permiten mantener condiciones controladas de iluminación, temperatura y pureza del cultivo (Mata, 2009). Para la agitación del material algal, los fotobiorreactores pueden emplear columnas de burbujas, hélices de accionamiento mecánico o bombas.

**Medio Arnon:** Mezcla de sales minerales y orgánicas, análoga al BBM; empleada por el laboratorio de Las Palmerillas, en Almería España. Es una variante del medio D11, desarrollado por Graham en 1982, con la solución B7, desarrollada por Arnon en 1938, (Andersen, 2005). Este medio usó alimentar las algas mientras se adelantaron los experimentos de floculación de la presente investigación.

**Microalga:** Alga microscópica, conformada por una o varias células. Para efectos de este estudio, se considerarán como tales también a las cianobacterias (excluidas por filologías recientes). Las microalgas se caracterizan por su capacidad de sintetizar su materia orgánica mediante la fotosíntesis; sin perder la capacidad



de alimentarse de forma heterótrofa cuando las condiciones resultan favorables (comportamiento facultativo) (Slade, 2013). Según la FAO (2009), se denomina así a una gran cantidad de especies que constituyen el fitoplancton, incluyen desde organismos autótrofos hasta microflagelados y microciliados auxótrofos. De acuerdo con Mata et al. (2009), las microalgas pueden ser microorganismos tanto procariotas como eucariotas capaces de multiplicarse rápidamente y de sobrevivir en condiciones difíciles gracias a su estructura unicelular o multicelular simple.

**Nutracéutico:** Sustancia que tiene propiedades tanto nutritivas como farmacéuticas (Borowitzka, 2013); su consumo solo o en compañía de otros alimentos sirve para estimular el comportamiento natural del organismo o fortalecerlo. La Enciclopedia Británica lo define como un tipo de sustancia alimenticia que ayuda a mantener la salud y prevenir enfermedades.

**Pax 18:** El policloruro de aluminio es un coagulante comercial, producido por Kemira; su fórmula química general es  $Al_n(OH)_mCl_{3n-m}$ . Dado el grupo funcional hidróxido (OH), el producto exhibe una mediana basicidad en soluciones diluidas; por el contrario, en soluciones concentradas, su pH es bastante bajo (por la disociación del ión de cloro. Es eficiente para el tratamiento de agua residual (Kemira, 2008). En la hoja de seguridad del producto (Kemira, 2007) se informa que:

El producto es una sustancia inorgánica. Durante la hidrólisis se forma un precipitado de hidróxido de aluminio, en el rango de pH de 5 a 7. El precipitado no es dañino para las algas, daphnia y peces.

Para el alga *Skeletonema costatum* (marina), el  $CI_{50}$ , 72 hr es mayor a 100 mg/l (Kemira, 2007).

## 8. Metodología

La investigación se adelantó de forma experimental a nivel de laboratorio, empleando la cepa de *Chlorella* sp. con que se contaba en la Universidad del Norte y una cepa de *Scenedesmus almeriensis* suministrada por la Universidad de Almería. Para la cepa de *Chlorella* sp. (esta última, como estimulante de la floculación de la primera), recolectada en cuerpos de agua del departamento del

Atlántico, en Colombia, se determinaron cuáles, de los factores que se encuentran en la literatura, son más significativos para su floculación.

### 8.1. Planificación

Se decidió adelantar las pruebas con cultivos de especies puras y de mezclas de cepas que se desarrollaron en recipientes de 1 litro de capacidad (como se aprecia en la Figura 7), empleando agua ultra pura tipo 1 (milli-Q®) y se complementó la nutrición con medios BBM y Arnon, con ellos se adelantaron pruebas de diferentes formas de separación de la biomasa y el líquido del cultivo.

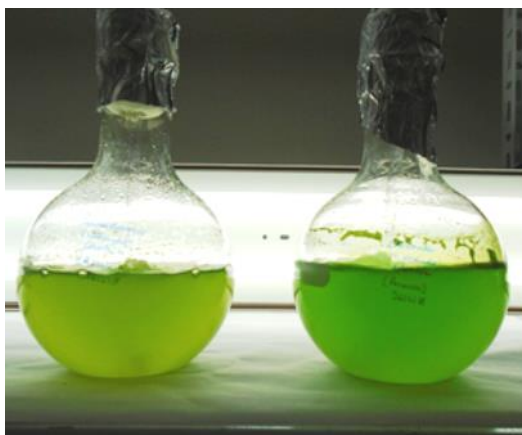


Figura 7. Cultivo de cepa de *Chlorella* sp.. Centro experimental Las Palmerillas, Cajamar y Universidad de Almería. Elaboración propia.

Para la etapa inicial de experimentación, se realizaron pruebas con un cultivo al aire libre dominado por *Scenedesmus almeriensis* con un fuerte componente de *Chlorella* sp. y otras especies de microorganismos, que se adelantaba en el laboratorio de las Palmerillas, en España. En este lugar se desarrolló la mayor parte de la fase experimental por contar con todo el equipo necesario para la misma.

Estos ensayos permitieron probar tratamientos específicos para determinar el tiempo que demandaban y descartar aquellos que no llenaran las expectativas de la investigación; sirvieron además para establecer rangos razonables para la aplicación de los diferentes tratamientos en la etapa experimental. En cada caso se compararon contra un “blanco” (alícuota de cultivo a la que se sometía a agitación y sedimentación sin aplicar en ella ningún otro tratamiento). No se controlaron ni la

composición exacta, ni la concentración de biomasa en el cultivo; ambas se vieron afectadas por las condiciones meteorológicas (lluvia, radiación solar, viento,...).

Se adelantaron pruebas con coagulante, floculante, coagulante y floculante combinados, adición básica (para subir el pH), y la aplicación de un campo eléctrico. Con excepción del ensayo con aplicación de campo eléctrico, los demás se adelantaron en tandas de 4 pruebas cada una, partiendo de muestras de 500 ml. La concentración de biomasa se midió mediante la determinación del peso seco de un volumen de 50 ml de cultivo filtrado en cada ocasión que se realizaron las pruebas.

Las muestras se repartieron en alícuotas de 100 ml colocadas en beakers para su agitación a baja velocidad, por tres minutos; luego se aplicaron los respectivos tratamientos y se incrementó la velocidad de agitación por cinco minutos adicionales. Inmediatamente se redujo a la velocidad inicial por dos minutos más.



Figura 8. Montaje experimental: beakers en los agitadores magnéticos, izquierda; beakers ya tratados antes de trasvasarse. Centro experimental Las Palmerillas, Cajamar y Universidad de Almería. Elaboración propia.

Luego se vació el contenido de cada beaker en una probeta graduada (de 100 ml) para registrar la sedimentación durante una hora. En este lapso se tomaron muestras, de 3 ml cada una, del sobrenadante en cada probeta; de forma simultánea se registró el nivel del sedimento (en milímetros) en cada una.



Figura 9. Montaje experimental: probetas ya cargadas y beakers en proceso de agitación, izquierda; probetas en proceso de sedimentación. Centro experimental Las Palmerillas, Cajamar y Universidad de Almería. Elaboración propia.

Posteriormente se procedió a determinar la concentración de cada muestra mediante un espectrofotómetro Genesys 30 de Thermo Fisher Scientific para líquidos (que se aprecia en la Figura 10), con él se determinaron la turbidez de una muestra antes y de todas luego de la floculación (Salim, 2012).



Figura 10. Espectrofotómetro Genesys 30, Thermo Fisher Scientific. Centro experimental Las Palmerillas, Cajamar y Universidad de Almería. Elaboración propia.

La prueba con electricidad se adelantó en beakers de 500 ml a los que se había adherido una escala graduada en milímetros; se colocaron dos electrodos metálicos (ánodo de aluminio y cátodo de acero inoxidable) y se aplicó una diferencia de potencial de 14 V suministrados por una fuente continua Freak M10-300A-03. La corriente se aplicó por un tiempo de 15 minutos luego de los cuales se esperon 30 minutos para apreciar la efectividad del tratamiento. No se obtuvieron

sedimentaciones apreciables con este procedimiento. En la siguiente figura se aprecia el montaje realizado.

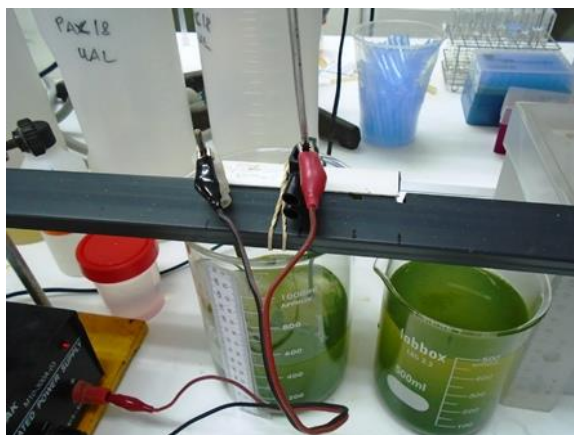


Figura 11. Montaje experimental: beakers en proceso de electrofloculación, izquierda; beaker de contraste, derecha. Centro experimental Las Palmerillas, Cajamar y Universidad de Almería. Elaboración propia.

Después de constatar la efectividad de los diferentes tratamientos, se probó la eficiencia de coagulación con cepas puras; de acuerdo con el diseño experimental previsto. Como punto de comparación se tomaron los resultados arrojados por una centrífuga convencional de operación continua (Acién, 2012). Como procedimientos alternativos de floculación, para comparar, se emplearon los encontrados significativos en la fase de prueba inicial, procedimientos todos en los que afecta la presencia de material extracelular exudado por las algas (Vandamme, 2014); con estos procedimientos se estimuló la floculación de la biomasa reduciendo la cantidad de energía necesaria para alcanzar un 20% de concentración de sólidos.

La vitalidad de las algas luego del tratamiento se estableció mediante una prueba de fotofluorescencia con fluorómetro PSI Aqua Pen producido por Photon Systems Instruments. Las muestras ya tratadas se conservaron por 15 minutos en probetas especiales para el instrumento; las probetas se privaron de contacto con la luz cubriéndolas con un vaso forrado de papel aluminio. Una vez al día, cada día, las probetas se llevaron a un cuarto con iluminación limitada, se detaparon una por una y se midió el “estado de su aparato fotosintético”; los resultados variaron poco en los tres días (ver tablas 10 y 14) y mostraron que el tratamiento de floculación no

había afectado a los microorganismo (los valores no diferían mucho de los arrojados por las algas antes del tratamiento).

No se midió el consumo de energía. Sin embargo, se considera que la reducción en el volumen a tratar se relaciona directamente con la disminución del consumo de energía pues la misma puede usarse, térmica, para evaporar el agua o, eléctrica, para centrifugar el cultivo. En cualquier caso, el consumo de energía es directamente proporcional al volumen a tratar y, al reducir al último, el primero disminuye proporcionalmente.

Una vez determinados los aditivos más convenientes, se procedió a establecer y seguir diseños experimentales apropiados para determinar los parámetros más favorables. Los experimentos se adelantaron de forma similar a la descrita para las pruebas iniciales. En este caso se midió la concentración de biomasa de las muestras, antes de cada tanda experimental, mediante el empleo del espectrofotómetro (a partir de curvas de concentración desarrolladas para esta serie de experimentos); la concentración medida se estandarizó mediante la adición de agua destilada, de manera que todos los tratamientos se hicieron a cultivos con una concentración muy similar.

## 8.2. Diseño experimental

Con el diseño experimental se buscaron las condiciones más favorables para reducir el contenido de agua en la biomasa de microalgas cosechada mediante floculación; se esperaba encontrar los factores para conseguir la captura la cepa de *Chlorella*, que finalmente se seleccionó, con un mínimo de agua y de consumo energético. Una de las alternativas que se evaluaron fue la adición de la cepa *Scenedesmus* como posible estimulador de la floculación.

Como primera medida, se determinaron las condiciones, factores, que pueden influir en los resultados esperados de la reducción del contenido de agua para la cosecha de las microalgas mediante floculación. Los factores controlables y no controlables del experimento son los que se listan a continuación, en la Tabla 2.

**Tabla 2. Factores potenciales de diseño y factores perturbadores del experimento.**

<b>Factores Potenciales de Diseño</b>	<b>Factores Perturbadores</b>
Nivel de iluminación Tipo de microalga Concentración de cepa añadida Hora de realización de la cosecha pH Etapa de crecimiento en que se adelanta la cosecha Adición de coagulante Adición de floculante	Temperatura ambiente Humedad relativa Presencia de material exoplasmático

### 8.2.1. Factores potenciales de diseño

Los factores potenciales de diseño sirvieron de base para formular el diseño experimental. En el proceso, se determinó cuántos y cuáles de ellos fueron efectivamente manipulados y se precisaron las razones para hacerlo.

Aún cuando, teóricamente, todos estos factores podían ser manipulados durante el experimento, se decidió mantener fijos algunos de ellos. Los factores que se mantuvieron fijos fueron el tipo de microalga, el nivel de iluminación, la hora de realización de la cosecha. El nivel de iluminación no resultó fácil de regular por la carencia de dispositivos automáticos para su control en el laboratorio; la hora de realización de la cosecha se mantuvo fija, a las 8:10 am por razones de logística en el Centro Experimental las Palmerillas. En cuanto a la concentración de la cepa añadida, la cepa base fue *Chlorella* sp. y se ensayó con la adición de distintas concentraciones de *Scenedesmus almeriensis* como una de las alternativas para estimular la floculación de la cepa base; las cantidades añadidas de esta segunda cepa se mantuvieron bajas, entre otras cosas para mantener las principales propiedades de la cepa principal.

Los otros factores se manipularon en el experimento: adición de floculante, adición de coagulante, adición de hidróxido de sodio (como una manera de aumentar el pH), adición de cepa añadida y etapa de crecimiento del cultivo.

Tabla 3. Clasificación de los factores controlables (elaboración propia).

<b>Factor de diseño</b>	<b>Tipo</b>	<b>Forma de medición</b>	<b>Rango de variación</b>
Adición de la cepa añadida	Cuantitativo	Medición con pipeta graduada.	0 ml a 10 ml
Adición de NaOH (para aumentar el pH)	Cuantitativo	Medición con pipeta graduada.	0 ml a 4 ml
Adición de coagulante	Cuantitativo	Medición con pipeta graduada.	0 ml a 0,4 ml
Adición de floculante	Cuantitativo	Medición con pipeta graduada.	0 ml a 1,2 ml
Etapa de crecimiento del cultivo base	Cualitativo		Principio a mediados de la etapa de “mesa”*

\* Se estimó el lapso entre 3 y 5 días de iniciado el cultivo

### 8.2.2. Factores perturbadores

Para el control de los factores perturbadores; se procuró mantenerlos en valores tan constantes como lo permitieron las condiciones de laboratorio. La temperatura ambiente se mantuvo constante alrededor de  $24 \pm 1$  °C. La humedad relativa se mantuvo baja por el sistema de acondicionamiento de aire pero su dependencia con las condiciones climáticas no pudo evitarse. En cuanto a la presencia de material exoplasmático (restos de algas, exsudación celular, restos de medio de cultivo,...) tan sólo se procuró determinar su presencia.

Tabla 4. Clasificación de los factores NO controlables (elaboración propia).

<b>Variable</b>	<b>Control</b>	<b>Forma de medición</b>	<b>Valores esperados</b>
Temperatura ambiente	Recinto con A.A.*	Termómetro	20 a 26 °C
Humedad relativa	Recinto con A.A.*	Termómetro de bulbo húmedo	50 a 70 %
Presencia de material exoplasmático	Ninguno	Apreciación visual	

\*Acondicionamiento de aire

Dadas las posibilidades de control, los dos primeros de estos factores se consideraron como no controlables y no pudieron determinarse con exactitud durante la ejecución de los experimentos. El tercero se consideró como ruido pues no era



posible, dentro de las limitaciones temporales del experimento, hacer una verificación completa de su condición.

### 8.2.3. Variable de respuesta

La variable de respuesta escogida para el proceso fue la efectividad másica; una combinación del factor de concentración y la variación en la densidad óptica del sobrenadante, medida antes del procedimiento y luego de finalizado. La efectividad másica se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$EM = FC \cdot \left( 1 - \frac{OD_{680_F}}{OD_{680_I}} \right)$$

Esta variable se escogió pues refleja al tiempo la reducción del volumen en que se concentra la mayor parte de la masa (factor de concentración) y la variación de la concentración del sobrenadante (relación de la densidad óptica, medida a 680 nm, antes y después de la sedimentación de la biomasa floculada). Ambos elementos, el factor de concentración y la relación de densidades (conocida como rendimiento) han sido empleadas por varios autores; pero su combinación es una propuesta de este estudio.

### 8.2.4. Estrategia de experimentación

En vista de que se determinaron cuatro factores con incidencia probablemente significativa en el proceso de floculación (y del gran número de condiciones asociadas a un diseño experimental completo que considere tantos factores), se decidió iniciar la experimentación con un diseño factorial  $2^4$  que permitiera establecer cuán significativos resultaban dichos factores y, si era posible, descartar algunos de ellos; para lo cual se estableció un valor  $\alpha = 0,03$ . Se empleó el software JMP® para obtener el diseño detallado que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño aleatorizado para la ejecución del experimento 2<sup>4</sup> de prueba de factores (elaborado a partir de resultados entregados por JMP®).

	Solución de NaOH*	Cultivo de <i>Scenedesmus</i> °	Solución de coagulante “	Solución de floculante <sup>a</sup>
Patrón	ml	ml	ml	ml
+++ -	4,0	10,0	0,2	0,0
-- + -	0,0	0,0	0,2	0,0
--- +	0,0	0,0	0,0	0,6
-+++	0,0	10,0	0,2	0,6
+++-	4,0	0,0	0,2	0,6
+-+-	4,0	10,0	0,0	0,0
--++	0,0	0,0	0,2	0,6
- - ++	0,0	0,0	0,2	0,6
-+++	0,0	10,0	0,2	0,6
+ - - -	4,0	0,0	0,0	0,0
+ - + -	4,0	0,0	0,2	0,6
++++	4,0	10,0	0,2	0,6
-+ - -	0,0	10,0	0,0	0,0
-+ - +	0,0	10,0	0,0	0,6
++++	4,0	10,0	0,2	0,6
----	0,0	0,0	0,0	0,0
+ - ++	4,0	0,0	0,2	0,6
+++-	4,0	10,0	0,2	0,0
0000	2,0	5,0	0,1	0,3
+ - - +	4,0	0,0	0,0	0,6
-+ + -	0,0	10,0	0,2	0,0
+ - - -	4,0	0,0	0,0	0,0
+ - - +	4,0	0,0	0,0	0,6
0000	2,0	5,0	0,1	0,3
-+ - +	0,0	10,0	0,0	0,6
-+ + -	0,0	10,0	0,2	0,0
-+ - -	0,0	10,0	0,0	0,0
+ - + -	4,0	0,0	0,2	0,0
- - + -	0,0	0,0	0,2	0,0
++ - +	4,0	10,0	0,0	0,3
----	0,0	0,0	0,0	0,0
- - - +	0,0	0,0	0,0	0,6
++ - -	4,0	10,0	0,0	0,0
++ - +	4,0	10,0	0,0	0,6

\*Solución 1N de NaOH en agua.

°Cultivo de *Scenedesmus almeriensis* con concentración aproximada de 0,48 g/l ( $\pm 0,06$  g/l)

“Solución de Pax 18 en agua de 12 g/l

<sup>a</sup>Solución de Actipol en agua de 1,8 g/l

Esta experimentación arrojó como resultado que los factores que más afectaban la coagulación y posterior sedimentación de las algas eran la adición de hidróxido de sodio y de coagulante (sus efectos eran similares y casi un 86% superiores al

del factor siguiente). Por lo que se adelantó un segundo experimento con un modelo  $3^2$  para optimizar considerando sólo estos dos factores; el diseño experimental resultante es el que se muestra a continuación. Un tercer factor, la adición de *Scenedesmus*, alcanzó un valor P muy próximo al nivel de significación escogido; pero muy superior al de los otros dos.

Tabla 6. Diseño aleatorizado para la ejecución del experimento  $3^2$  de prueba de factores (elaborado a partir de resultados entregados por JMP®).

<b>Patrón</b>	<b>Solución de NaOH*</b>	<b>Solución de coagulante "</b>
	ml	ml
- 0	0,0	0,1
0 +	1,0	0,2
+ +	2,0	0,2
0 0	1,0	0,1
+ +	2,0	0,2
0 0	1,0	0,1
+ 0	2,0	0,1
- 0	0,0	0,1
0 -	1,0	0,0
+ 0	2,0	0,1
+ -	2,0	0,0
0 +	1,0	0,2
- -	0,0	0,0
0 -	1,0	0,0
+ -	2,0	0,0
- +	0,0	0,2
- +	0,0	0,2
- -	0,0	0,0

\*Solución 1N de NaOH en agua.

"Solución de Pax 18 en agua de 12 g/l

## 9. Cronograma de experimentación

En pruebas previas se determinó que el tiempo para correr una sola condición experimental era de cerca de dos horas y media (2 hr y 22'); como se contaba con cuatro agitadores idénticos, se podían adelantar simultáneamente cuatro condiciones de experimentación. Por otro lado, las instalaciones estaban disponibles sólo durante siete horas al día; así que podían adelantarse sólo dos tandas de experimentación diarias, equivalentes a ocho condiciones diarias. En consecuencia, el primer experimento se desarrolló durante una semana; trabajando dos tandas diarias de lunes a jueves y una sola el día viernes. Las 18 condiciones

del segundo experimento se completaron en tres días, realizando ocho diarias los días miércoles y jueves, y dos el viernes, todo durante la siguiente semana.

Se escogió esta estrategia para minimizar el efecto del estado del cultivo en los resultados experimentales; así que ambos experimentos se completaron en dos semanas mientras se mantenían constantes las condiciones de cultivo. Las variaciones en la densidad celular se compensaron igualando la absorbancia mediante la adición de agua destilada.

## 10. Rangos de composición del material ensayado

Dados los numerosos elementos manejados (agua, el medio de nutrición del cultivo, dos especies de algas y tres aditivos distintos), se presentan los rangos de concentración posibles de los distintos elementos en el material tratado.

### 10.1. Medio de Nutrición

El medio de nutrición suministrado a las algas que se emplearon durante los experimentos se denomina Arnon; sus componentes y concentraciones se listan en la Tabla 7, a continuación.

Tabla 7. Composición del medio Arnon.

Sustancia	Fórmula química	Concentración (mg/l)
Vanadiato de sodio	$\text{NaVO}_3$	0,230
Molibdenato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,260
Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,860
Cloruro de manganeso	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,222
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,004
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15,0
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	124,0
Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	117,0
EDTA*	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	86,022
Hidróxido de potasio	$\text{KOH}$	55,914
Sulfato de hierro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,637
Difosfato de potasio	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	696,0
Agar**	Polímero de galactosa	11000,0

\*Ácido etilendiaminotetraacético

\*\*Sustancia gelatinosa obtenida de las algas rojas; mezcla de agarosa y agarpectina.

El medio se aplica al principio del cultivo en una proporción 50/50 con agua destilada; pero, luego de que el cultivo se establece, se adicionan unos 50 ml a cada litro de cultivo, semanalmente. Así que, dado que el cultivo no se alimentó durante la semana en que se adelantó la experimentación, se puede asumir que la concentración de estas sustancias fue un cincuentavo de la indicada (valores residuales que las algas no hubieran alcanzado a metabolizar).

## 10.2. Biomasa algal

Las concentraciones de biomasa registradas en los cultivos (antes de la dilución para estandarizar) eran próximas a 1 g/l. Para efectos de contar con suficiente cultivo para toda la experimentación y de tener condiciones similares durante las diferentes pruebas, la concentración de *Chlorella* sp. se redujo a cerca de la tercera parte y la de *Scenedesmus almeriensis* se llevó a 0,5 g/l. Fue de esta concentración de cultivo de la cepa que se tomaron, según la condición experimental correspondiente, las cantidades que se indican en la tabla 5.

## 10.3. Hidróxido de sodio y otros aditivos

El hidróxido de sodio se preparó en una solución 1 N, lo que quiere decir que se trataba de una solución de 49 mg<sub>NaOH</sub>/l<sub>H<sub>2</sub>O</sub>. El coagulante, Pax 18, se preparó a una concentración de 12 g/l y el floculante, Actipol, a 1,8 g/l. Todas estas soluciones se usaron como base y se adicionaron, según la condición experimental, las cantidades indicadas en la tabla 5.

## 10.4. Rango de concentraciones

Dados los anteriores valores de concentración y los rangos de aplicación de las distintas sustancias, cada alícuota de 100 ml tenía la masa de cada sustancia que se indica en la siguiente tabla.

Tabla 8. Composición de una probeta típica de cultivo luego del ensayo.

Sustancia		Valor 1 (mg)	Valor 2 (mg)
NaVO <sub>3</sub>	entre	1,518x10 <sup>-4</sup>	1,324x10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	entre	8,316x10 <sup>-4</sup>	7,252x10 <sup>-4</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	entre	1,888x10 <sup>-3</sup>	1,646x10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	entre	1,465x10 <sup>-4</sup>	1,278x10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	entre	5,214x10 <sup>-5</sup>	4,547x10 <sup>-5</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	entre	2,660x10 <sup>-5</sup>	2,319x10 <sup>-5</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	entre	9,900x10 <sup>-3</sup>	8,633x10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	entre	8,184x10 <sup>-2</sup>	7,136x10 <sup>-2</sup>
NaCl	entre	7,722x10 <sup>-2</sup>	6,734x10 <sup>-2</sup>
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	entre	5,677x10 <sup>-2</sup>	4,951x10 <sup>-2</sup>
KOH	entre	3,690x10 <sup>-2</sup>	3,218x10 <sup>-2</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	entre	2,484x10 <sup>-2</sup>	2,166x10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	entre	4,594x10 <sup>-1</sup>	4,006x10 <sup>-1</sup>
Agar	entre	7,260	6,331
<i>Chlorella</i> sp.	entre	33,000	28,776
NaOH	entre	0,000	98,000
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	entre	0,000	5,000
Pax 18 (Coagulante)	entre	0,000	2,400
Actipol (floculante)	entre	0,000	1,080
Agua	entre	99959,000	99857,800

De los anteriores valores se aprecia que sólo el hidróxido de sodio llegaba a representar una masa mayor (aunque del mismo orden de magnitud) que la del alga en el cultivo cuyo comportamiento se analiza (98 mg de hidróxido de sodio en el primer experimento y 49 mg en el segundo, para unos 28,78 mg de *Chlorella* sp.); dada la completa disolución del hidróxido de sodio en el agua, no se espera que se generen efectos mecánicos por su concentración en el medio.

## 11. Resultados experimentales

### 11.1. Experimento de tamizado

El primer experimento, adelantado entre los días 4 y 8 de junio de 2018, arrojó los resultados que se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados medidos del primer experimento (2<sup>4</sup>). Elaboración propia

Tratamiento (patrón)	Concentración del cultivo (g/l)	Altura inicial* (mm)	Altura concentrada** (mm)	Densidad óptica inicial @680nm	Densidad óptica final^ @680nm
+ + + -	0,329	143	110	1,066	0,928
- - + -	0,329	143	110	1,066	0,928
- - - +	0,329	143	108	1,066	0,854
- + + +	0,329	143	5	1,066	0,405
+ - + +	0,321	145	145	0,972	0,779
+ + - -	0,321	145	145	0,962	0,708
- - + +	0,321	137	108	0,962	0,495
- - + +	0,321	139	111	0,962	0,668
- + + +	0,303	150	9	0,990	0,085
+ - - -	0,303	145	108	0,990	0,696
+ - + -	0,303	140	108	0,990	0,922
+ + + +	0,303	145	114	0,990	0,668
- + - -	0,303	140	104	0,996	0,884
- + - +	0,303	142	108	0,996	0,812
+ + + +	0,303	150	115	0,996	0,866
- - - -	0,303	145	109	0,996	0,674
+ - + +	0,318	141	104	0,852	0,784
+ + + -	0,318	141	104	0,852	0,854
0 0 0 0	0,318	140	102	0,852	0,788
+ - - +	0,318	138	138	0,852	0,788
- + + -	0,318	140	5	0,990	0,132
+ - - -	0,318	145	114	0,990	0,914
+ - - +	0,318	140	113	0,990	0,956
0 0 0 0	0,318	145	112	0,990	0,960
- + - +	0,323	147	115	0,992	0,808
- + + -	0,323	150	5	0,992	0,186
- + - -	0,323	142	114	0,992	0,842
+ - + -	0,323	140	140	0,992	0,814
- - + -	0,323	137	5	1,084	0,101
+ + - +	0,323	147	117	1,084	0,900
- - - -	0,323	135	104	1,084	0,916
- - - +	0,323	137	109	1,084	0,962
+ + - -	0,321	143	143	0,982	0,864
+ + - +	0,321	143	143	0,982	0,838

\*La alcanzada por la alícuota de cultivo, ya tratada, en cada probeta marcada.

\*\*La alcanzada por el sedimento y/o material flotante, luego de una hora, en cada probeta

^La densidad óptica final se midió en el líquido clarificado luego de la separación.

Los anteriores datos se emplearon para calcular, el factor de concentración y la variable de respuesta: efectividad másica (de acuerdo con las fórmulas explicadas en la sección 8.2.3), de cada prueba con cada tratamiento. Se obtuvieron los valores relacionados en la siguiente tabla; en ella se registra también el valor del parámetro Fv/Fm, medido para establecer el grado de vitalidad de la biomasa tratada.

Tabla 10. Resultados calculados del primer experimento (2<sup>4</sup>). Elaboración propia

Tratamiento	Concentración del cultivo (g/l)	Factor de concentración	Efectividad másica	Fv/Fm
+++ -	0,329	1,30	1,04	No medida
-- + -	0,329	1,30	1,04	No medida
--- +	0,329	1,32	1,06	No medida
-+++	0,329	28,60	18,11	No medida
+++-	0,321	1,00	1,00	No medida
++--	0,321	1,00	1,00	No medida
-+++	0,321	1,27	1,10	No medida
--++	0,321	1,25	1,06	No medida
-+++	0,303	16,67	15,32	No medida
+- - -	0,303	1,34	1,10	No medida
+ - + -	0,303	1,30	1,02	No medida
++++	0,303	1,27	1,09	No medida
-+ - -	0,303	1,35	1,02	No medida
-+ - +	0,303	1,31	1,06	No medida
++++	0,303	1,30	0,95	No medida
----	0,303	1,33	1,06	No medida
+ - ++	0,318	1,36	1,00	0,60
+++ -	0,318	1,36	1,03	0,61
0000	0,318	1,37	1,04	0,63
+ - - +	0,318	1,00	1,00	0,60
-++ -	0,318	28,00	25,28	0,61
+ - - -	0,318	1,21	1,01	0,61
+ - - +	0,318	1,15	1,01	0,60
0000	0,318	1,19	0,98	0,59
-+ - +	0,323	1,28	1,02	0,65
-++ -	0,323	30,00	24,72	0,62
-+ - -	0,323	1,25	1,03	0,63
+ - + -	0,323	1,00	1,00	0,58
- - + -	0,323	27,40	24,94	0,63
++ - +	0,323	1,26	1,02	0,60
- - - -	0,323	1,30	1,04	0,62
- - - +	0,323	1,26	1,00	0,61
++ - -	0,321	1,00	1,00	0,62
++ - +	0,321	1,00	1,00	0,61

## 11.2. Primer análisis experimental

Con la ayuda de Microsoft Excel® para Mac, se adelantó el análisis de varianza del experimento previo para establecer la significancia de los factores escogidos. Primero se calcularon los contrastes, efectos y suma de cuadrados (SS) a partir de los resultados experimentales; los resultados se presentan en la siguiente tabla. Los factores se designaron A (nivel de adición de la solución de NaOH), B (nivel de



adición del cultivo de *Scenedesmus almeriensis*, C (nivel de adición de la solución de coagulante) y D (nivel de adición de la solución de floculante).

Tabla 11. Cálculo de contrastes, efectos y suma de cuadrados (SS) del primer experimento (2<sup>4</sup>). Elaboración propia.

<b>Factor</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>AB</b>	<b>AC</b>	<b>AD</b>	<b>BC</b>	<b>BD</b>	<b>CD</b>	<b>ABC</b>	<b>ABD</b>	<b>ACD</b>	<b>BCD</b>	<b>ABCD</b>
Contr.	-103,6	55,3	103	-40,5	-55,3	-103,0	40,3	55,5	7,43	-40,4	-55,1	-7,21	40,4	7,05	-7,31
Efecto	-6,47	3,45	6,45	-2,53	-3,45	-6,46	2,52	3,47	0,46	-2,52	-3,45	-0,45	2,53	0,44	-0,46
SS	335,3	95,4	333	51,3	95,5	333	50,7	96,3	1,73	50,9	95	1,62	51	1,55	1,67

Luego se empleó esta información para efectuar el análisis de varianza (ANOVA) que se resume en la siguiente tabla. Los valores de los efectos sirvieron, como se explica más adelante, para construir la función de predicción del modelo.

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) del primer experimento (2<sup>4</sup>). Elaboración propia

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Razón F</b>	<b>Valor P</b>
A: Solución de NaOH	335,340	1	335,340	19,40	0,0003
B: Cultivo de <i>Scenedesmus</i>	95,393	1	95,393	5,52	0,0304
C: Solución de coagulante	333,272	1	333,272	19,28	0,0004
D: Solución de floculante	51,334	1	51,334	2,97	0,1020
AB	95,462	1	95,462	5,52	0,0304
AC	333,401	1	333,401	19,29	0,0004
AD	50,677	1	50,677	2,93	0,1040
BC	96,293	1	96,293	5,57	0,0297
BD	1,725	1	1,725	0,10	0,7557
CD	50,879	1	50,879	2,94	0,1034
ABC	94,979	1	94,979	5,50	0,0307
ACD	51,030	1	51,030	2,95	0,1029
BCD	1,533	1	1,533	0,09	0,7678
ABCD	1,670	1	1,670	0,10	0,7595
Efecto cuadrático puro	19,810	1	19,810	1,15	0,2985
Error Total	476,651	18	17,284		
Total	1946,840	33			

La primera conclusión que se puede extraer de estos resultados se relaciona con el valor P. Este parámetro indica la probabilidad de que cada uno de los factores analizados no incida en las variaciones experimentadas por la efectividad másica (variable de respuesta) a lo largo del experimento y fueron cuatro los factores que presentaron valores inferiores al  $\alpha$  escogido (Montgomery, 2008). Se observa que los valores más bajos de él corresponden a la adición de hidróxido de sodio (valor

P de 0,0003) y a la de coagulante (valor P de 0,0004), lo mismo que al efecto conjunto de estos dos factores, son dos órdenes de magnitud inferiores al efecto de la adición del cultivo de *Scenedesmus* y tres órdenes inferiores al efecto de añadir la solución floculante; el otro factor que cumplió con el criterio, BC (interacción entre las adiciones de *Scenedesmus* y de coagulante), no se consideró por incluir a uno de los factores que sobrepasó el criterio límite.

El análisis directo de los efectos se efectuará mediante las gráficas de contorno de los dos efectos con mayor valor. Las mismas se construyeron a partir de la función de predicción del modelo:

$$EM = \overline{EM} + \frac{EF_A}{2}A + \frac{EF_B}{2}B + \frac{EF_C}{2}C + \frac{EF_D}{2}D + \frac{EF_{AB}}{2}AB + \frac{EF_{AC}}{2}AC + \frac{EF_{AD}}{2}AD + \frac{EF_{BC}}{2}BC + \frac{EF_{BD}}{2}BD + \frac{EF_{CD}}{2}CD + \frac{EF_{ABC}}{2}ABC + \frac{EF_{ABD}}{2}ABD + \frac{EF_{ACD}}{2}ACD + \frac{EF_{BCD}}{2}BCD + \frac{EF_{ABCD}}{2}ABCD \rightarrow$$

$$EM = 4,25 - 3,24A + 1,73B + 3,22C - 1,26D - 3,23AC + 1,26AD + 1,74BC + 0,23BD - 1,26CD - 1,73ABC - 0,23ABD + 1,27ACD + 0,22BCD - 0,23ABCD$$

Esta última ecuación se reduce haciendo constantes los valores de los factores B y D (en las diferentes combinaciones de sus valores máximo y mínimo) y se construyen las gráficas correspondientes para cada conjunto de valores. A continuación se muestra la gráfica correspondiente a los valores inferiores de los factores B y D (sin adición de *Scenedesmus* ni de floculante).

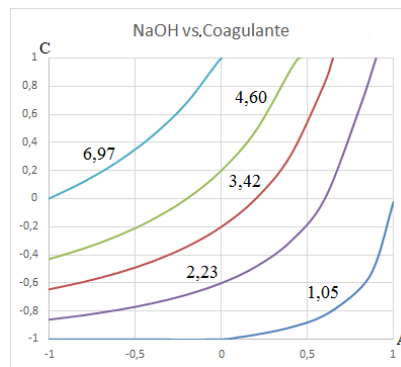


Figura 12. Curvas de efectividad másica constante, sin adición de *Scenedesmus almeriensis* ni de Actipol. Elaboración propia. Se marca con la letra C el eje correspondiente a la adición de coagulante y con A el correspondiente a la adición de NaOH; los valores en los ejes indican, en variable codificada, los niveles de adición de cada factor.

Es claro que, en estas condiciones, la adición de la solución de hidróxido de sodio (factor A) desestimula la efectividad másica mientras que la de coagulante (factor C) la mejora. También se aprecia que el efecto del coagulante es mayor cuanto menos hidróxido se agregue.

Ahora se repite el análisis para el caso en que el floculante (factor D) se halla en su máximo nivel, pero no se ha añadido *Scenedesmus* (factor B). En este caso, el efecto del coagulante y el del floculante parece anularse y el valor alcanzado por la efectividad másica depende sólo del nivel añadido de hidróxido de sodio.

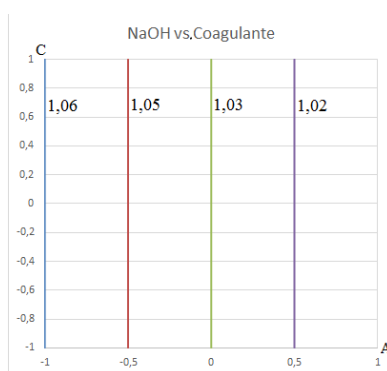


Figura 13. Curvas de efectividad másica constante, sin adición de *Scenedesmus almeriensis* y adición de floculante (Actipol) . Elaboración propia. Se marca con la letra C el eje correspondiente a la adición de coagulante y con A el correspondiente a la adición de NaOH; los valores en los ejes indican, en variable codificada, los niveles de adición de cada factor.

La siguiente gráfica ilustra el comportamiento cuando se añaden tanto *Scenedesmus* como floculante. Al igual que en el primer caso, las curvas indican que la mayor efectividad másica se encuentra a valores bajos de hidróxido y altos de coagulante.

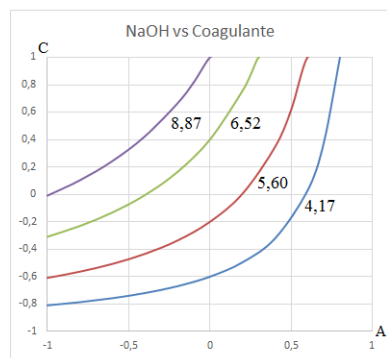


Figura 14. Curvas de efectividad másica constante, con adición de *Scenedesmus almeriensis* y de floculante (Actipol) . Elaboración propia. Se marca con la letra C el eje correspondiente a la adición de coagulante y con A el correspondiente a la adición de NaOH; los valores en los ejes indican, en variable codificada, los niveles de adición de cada factor.

Al añadir *Scenedesmus* en ausencia de floculante, se obtienen las curvas que se muestran en la siguiente figura. La disposición de las curvas es similar a la del caso previo; pero se apreciaron mayores valores de efectividad másica.

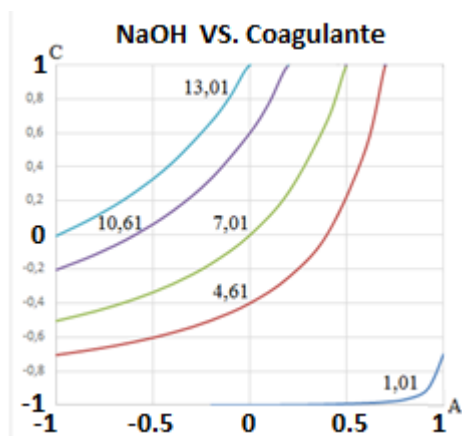


Figura 15. Curvas de efectividad másica constante, con adición de *Scenedesmus almeriensis* y sin añadir floculante (Actipol) . Elaboración propia. Se marca con la letra C el eje correspondiente a la adición de coagulante y con A el correspondiente a la adición de NaOH; los valores en los ejes indican, en variable codificada, los niveles de adición de cada factor.

Con base en los anteriores resultados, se decidió proseguir la experimentación para los dos factores más relevantes: la adición de la solución de hidróxido de sodio y de coagulante. Correspondientes a los factores A y C del primer diseño experimental; estos factores tuvieron, respectivamente, unos efectos de -6,47 y 6,45, casi idénticos al obtenido por el efecto cruzado de ambos.

Los valores escogidos para la optimización fueron los correspondientes al rango bajo de la adición de hidróxido de sodio y el rango completo de adición de coagulante pues es claro que el menor nivel del primero estimula la floculación, mientras que el comportamiento del segundo no es tan evidente (parece aumentar con el aumento del coagulante, pero no es lineal).

### 11.3. Experimento de optimización

La nueva experimentación se adelantó de acuerdo con el orden aleatorio propuesto por el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.II® y a continuación se relacionan los resultados.

Tabla 13. Resultados medidos del segundo experimento (3<sup>2</sup>). Elaboración propia

Tratamiento (patrón)	Concentración del cultivo (g/l)	Altura inicial* (mm)	Altura concentrada** (mm)	Densidad óptica inicial @680nm	Densidad óptica final @680nm
- 0	0,282	135	5	1,550	0,165
0 +	0,358	150	138	1,462	1,376
+ +	0,358	144	133	1,376	1,272
0 0	0,358	144	131	1,404	1,272
+ +	0,282	140	140	1,490	1,350
0 0	0,282	144	144	1,518	1,276
+ 0	0,282	138	138	1,473	1,376
- 0	0,382	146	4	0,978	0,005
0 -	0,320	140	130	1,124	1,010
+ 0	0,320	149	140	1,104	1,028
+ -	0,320	138	130	1,124	1,048
0 +	0,320	135	127	1,166	1,066
- -	0,320	136	125	1,238	0,826
0 -	0,320	145	145	1,110	1,130
+ -	0,320	139	139	1,192	1,070
- +	0,320	135	8	0,998	0,034
- +	0,331	140	7	1,248	0,017
- -	0,331	140	130	1,182	0,932

A partir de los resultados experimentales, se calcularon tanto el factor de concentración como la efectividad másica de cada prueba con cada tratamiento. Se obtuvieron los valores que se relacionan en la Tabla 14, a continuación.

Tabla 14. Resultados calculados del segundo experimento (3<sup>2</sup>). Elaboración propia

Tratamiento	Concentración del cultivo (g/l)	Factor de concentración	Efectividad másica	Fv/Fm
- 0	0,282	28,00	28,00	0,48
0 +	0,358	1,09	1,09	0,46
+ +	0,358	1,08	1,08	0,46
0 0	0,358	1,10	1,10	0,47
+ +	0,282	1,02	1,02	0,45
0 0	0,282	1,04	1,04	0,47
+ 0	0,282	1,04	1,04	0,46
- 0	0,382	37,00	36,00	0,45
0 -	0,320	1,08	1,08	0,49
+ 0	0,320	1,06	1,06	0,45
+ -	0,320	1,06	1,05	0,46
0 +	0,320	1,06	1,06	0,47
- -	0,320	1,12	1,06	0,52
0 -	0,320	1,03	1,00	0,48
+ -	0,320	0,99	1,00	0,47
- +	0,320	16,00	12,20	0,50
- +	0,331	21,00	18,50	0,53
- -	0,331	1,08	1,06	0,54

#### 11.4. Segundo análisis experimental

La segunda fase experimental se analizó también con la ayuda del software Statgraphics Centurion XVI.II®. Primero se ejecutó, en Microsoft Excel® el análisis de varianza para establecer la significancia de los factores escogidos; empleando los contrastes y procedimientos sugeridos por Gutiérrez (2012).

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) del segundo experimento ( $3^2$ ). Resultado calculado con la ayuda de Microsoft Excel®.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
$A_L$	683,580	1	683,580	118,645	$1,75 \times 10^{-6}$
$A^2$	226,650	1	226,650	39,339	0,000146
$B_L$	68,641	1	68,641	11,914	0,007256
$B^2$	252,170	1	252,170	43,769	$9,75 \times 10^{-5}$
$A_L B_L$	101,750	1	101,750	17,659	0,002299
$A_L B^2$	377,072	1	377,072	65,447	$2,02 \times 10^{-5}$
$A^2 B_L$	33,820	1	33,820	5,870	0,038433
$A^2 B^2$	125,691	1	125,691	21,816	0,001167
Error Total	51,854	9	5,762		
Total	1921,226	17			

A partir de los valores P de los diferentes factores, se puede establecer que casi todos (con excepción de la interacción entre la componente cuadrática de la adición de hidróxido y la lineal de coagulante) cumplen con el valor  $\alpha$  criterio. Por otra parte, los valores más bajos de P corresponden a la componente lineal de la adición de hidróxido de sodio ( $1,75 \times 10^{-6}$ ) y a la componente cuadrática de la adición de coagulante ( $9,75 \times 10^{-5}$ ) y, por supuesto, a la interacción de ellos ( $2,02 \times 10^{-5}$ ).

El análisis de la gráfica de efectos muestra una importante curvatura en ambos factores; más marcada para los valores altos de adición de hidróxido de sodio. Es claro que la adición de hidróxido desfavorece la floculación, mientras la de coagulante la estimula pero hasta cierto nivel.

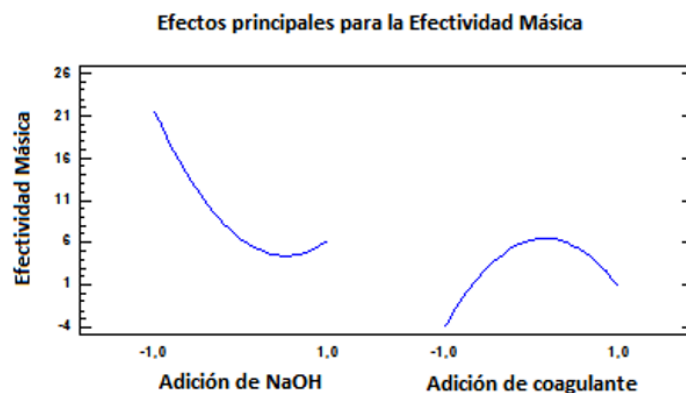


Figura 16. Gráfica de los efectos principales, adición de hidróxido de sodio y de coagulante, en la efectividad másica de la floculación de un cultivo de *Chlorella* sp.. Obtenida de Statgraphics Centurion XVI.II®.

Del diagrama de Pareto de los efectos, mostrado a continuación, se aprecia que el efecto conjunto de las adiciones de NaOH y de coagulante es menor al de la adición de hidróxido y al efecto cuadrático de ambos factores.

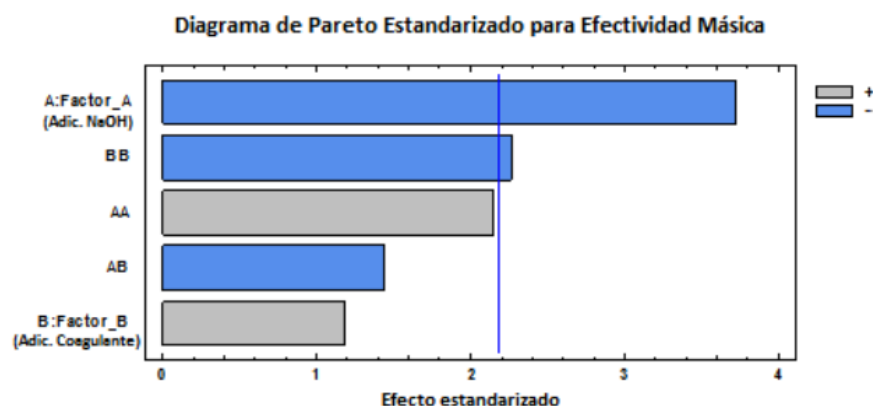


Figura 17. Diagrama de Pareto de los efectos principales y cuadráticos en la efectividad másica de la floculación de un cultivo de *Chlorella* sp.. Obtenida de Statgraphics Centurion XVI.II®.

Al analizar la superficie de respuesta de este experimento, presentada en la figura a continuación, se observa más claramente lo discutido con anterioridad: la región óptima para la floculación se halla al aplicar valores intermedios de floculante, prescindiendo de la adición de hidróxido de sodio.

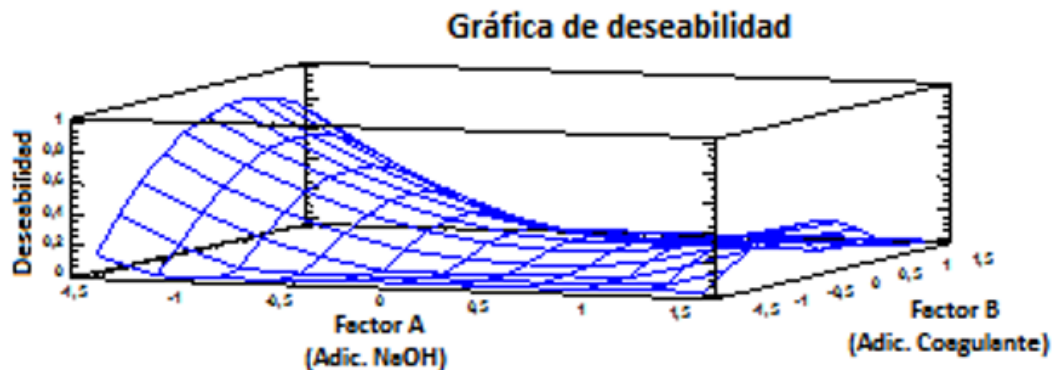


Figura 18. Gráfica de deseabilidad de los efectos principales, adición de hidróxido de sodio y de coagulante, en la efectividad másica de la floculación de un cultivo de *Chlorella* sp.. Obtenida de Statgraphics Centurion XVI.II®.

Este parámetro, la deseabilidad, constituye un cociente entre el valor máximo esperado para la efectividad másica (se fijó en 40 para el análisis experimental) y el que se alcanzó durante el experimento. Su proximidad a 1, para valores cercanos al 0 en la adición de coagulante, indica que el valor óptimo está en esta zona.

## 12. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos confirman lo encontrado por numerosos autores en el sentido de que alteraciones en el pH (inducidas, en este caso, por la adición de hidróxido de sodio) y la presencia de sustancias coagulantes favorecen la formación de aglomerados de células y, con ello, la separación de las fases líquida y suspendida de un cultivo de algas. Al igual que lo encontrado por Liu (2013) para otras especies de agua dulce, la floculación de *Chlorella* sp. parece favorecerse con los niveles más bajos de pH, un resultado que contrasta con lo hallado por García-Pérez y Vandamme (2014) quienes, junto con sus colaboradores encontraron aumentos en la eficiencia de floculación, en presencia de hidróxido de magnesio, a medida que aumentaba el pH. Se resalta el hecho de que los análisis en el segundo caso (García-Pérez, 2014) se adelantaron específicamente para *Chlorella vulgaris*. Una posible explicación a esta discrepancia es la dada por el segundo autor: que el hidróxido de magnesio comienza a precipitarse para valores de pH superiores a 10,5.



En la presente investigación no se registraron variaciones importantes en la fluorescencia de la clorofila para las células sometidas a altos y bajos niveles de adición de NaOH; sin embargo, parece mejor para la conservación de la vitalidad del cultivo, para la facilidad de adelantar tratamientos posteriores y para la economía del proceso, el empleo de bajas concentraciones de hidróxido de sodio.

La adición de Pax 18 exhibió un comportamiento distinto; la efectividad másica alcanza su valor óptimo a medida que se aumenta la concentración hasta un valor relativamente bajo, 1,2 mg/l; al aumentar por encima de este valor la concentración de coagulante en el cultivo, la efectividad másica comienza a disminuir. Los valores de efectividad más altos que se alcanzaron fueron de 28 en una prueba y 36 en la réplica. Dado el hecho de que Pax 18 es un policloruro de aluminio de mediana basicidad, resulta alentador que el efecto de máxima floculación se obtenga para bajas concentraciones de la sustancia. Hay que recordar que, en las condiciones del estudio, la concentración de *Chlorella* era de unos 31 mg/l, unas 26 veces superior a la del coagulante.

En cuanto a la fluorescencia de la clorofila o, más exactamente, la eficiencia fotosintética del fotosistema II empleada como indicador de la vitalidad de las células (González, 2008), en esta investigación, no exhibió variaciones significativas con respecto a valores medidos en el laboratorio para algas sin tratar; el promedio de las mediciones del primer experimento fue de 0,61 y el valor medido en algas no estresadas es de 0,7 (dato reportado por la bióloga Martina Ciardi, responsable del cepario en el laboratorio de Las Palmerillas). Los valores registrados en el segundo experimento fueron menores, 0,48, pero no lo suficiente para indicar una afectación en el mecanismo fotosintético de las algas.

De acuerdo con la concentración en el volumen obtenida mediante el tratamiento de floculación, el consumo energético para el secado del cultivo por calentamiento pasaría de 2144 kJ por litro de cultivo cosechado, a sólo 71,47 kJ por litro de cultivo cosechado, pues sólo habría que secar un treintavo del volumen.

Según los números encontrados por Acién (2012), si el tratamiento escogido para el secado fuese el de centrifugación continua, estos consumos pasarían de 11,73 kJ/l a 0,39 kJ/l, pues en la actualidad se tienen consumos de 33 kW.h/día para

el procesamiento de unos 10130 l/día de cultivo con una concentración de biomasa de 1,26 g/l. Es importante acotar que los consumos energéticos de la centrifugación se obtuvieron para un cultivo, en fotobiorreactor, de *Scenedesmus almeriensis*; no de la variedad de *Chlorella* empleada para esta investigación.

### 13. Conclusiones

Los resultados obtenidos constituyen un hallazgo prometedor en la búsqueda de generalizar el cultivo de microalgas como una forma eficaz de capturar el dióxido

de carbono emitido por las operaciones industriales, pues constituyen un procedimiento viable para extraer la biomasa algal producida.

Se apreció que, cuando se emplea *Chlorella* sp. recolectada en cuerpos de agua de la Región Caribe colombiana, la adición de pequeñas concentraciones (alrededor de 1,2 mg por litro de cultivo) del coagulante comercial Pax 18 permiten efectividades másicas de cerca de 32; lo que significa que el volumen de cultivo a tratar para un secado adicional se reduce a menos de la treintava parte. Los otros métodos empleados permitieron, por si solos, efectividades másicas máximas de 1,2 para la adición de hidróxido de sodio; 1,03 para la adición de la cepa *Scenedesmus almeriensis* y 1,06 para la adición del floculante Actipol.

Aún cuando las pruebas realizadas durante las etapas experimentales siguieron un protocolo idéntico para todos los tratamientos y, por consiguiente, dieron lugar a consumos de energía idénticos; se puede afirmar que aquellos que generaron mayores efectividades másicas (más biomasa concentrada en volúmenes menores) demandarán menos energía en los tratamientos posteriores que se emprendan; por lo que se puede concluir que, en este rubro, el tratamiento más económico resultó el empleo de coagulante pues permitió concentrar casi toda la biomasa en un volumen de cerca de un treintavo del original.

Ninguna de las pruebas realizadas afectó significativamente la vitalidad, medida como la reducción de la fluorescencia de la clorofila (relación  $F_v/F_m$ ) medida luego de una hora en la oscuridad, tras realizado el tratamiento. Con respecto a la medición de los cultivos antes de realizado el tratamiento, la reducción en este parámetro fue del 12,5% durante el primer experimento y del 31,4% en el segundo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método más conveniente para la floculación de microalgas en la Región Caribe colombiana, es la adición de Pax 18; hay que considerar además que, de acuerdo con su hoja de seguridad, este producto no resulta nocivo para las microalgas y se produce en Latinoamérica (es un producto de la empresa Kemira, de México).

#### 14. Futuras Líneas de Investigación

Dado el efecto creciente en la efectividad másica apreciado para la disminución en la adición de NaOH y los resultados reportados por Liu y sus colaboradores (2013), sería conveniente probar el efecto de añadir ácidos débiles (como el zumo de frutos cítricos cultivados en la Región Caribe colombiana) para determinar si esto potencia aún más la concentración del material floculado.

El otro factor, la adición de otras cepas de microalgas, arrojó efectos inferiores a los de los efectos que se escogieron para la optimización pero no tan bajos que se puedan descartar del todo. Particularmente resulta de interés el hecho de que este factor parece potenciar el efecto del coagulante. Por lo anterior, vale la pena explorar también este factor; empleando tal vez otras cepas más comunes en la región.

Otro tema importante a revisar, son las reducciones energéticas que realmente se podrían esperar; al aplicar los números reportados por Acién (2012) a los factores de concentración y efectividad másica encontrados, se esperaría, hipotéticamente, que el consumo de energía para el centrifugado pasara de 33 kW.h/día a 1,22 kW.h/día (considerando que el 90% de la biomasa quedaría en el floculado) para una producción anual de 3,83 toneladas de biomasa. Estos números hay que verlos con cuidado porque los reportados en el artículo provienen de un cultivo axónico de *Scenedesmus almeriensis*, no de *Chlorella* sp.; adicionalmente, en algunas pruebas que se realizaron en el transcurso de esta investigación, con biomasa proveniente del cultivo al aire libre, la eficiencia de la centrífuga se redujo considerablemente al operar con un cultivo concentrado a cerca de un quinceavo de su volumen original.

## 15. Referencias

- Acién, F., Fernández, J., Magán, J., Molina, E. (2012). Production costs of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances* 30, 1344-1353. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.005
- Agbakpe, M., Ge, S., Zhang, W., Zhang, X., Kobylarz, P. (2014) Algae harvesting for biofuel production: influences of UV irradiation and polyethylenimine

(PEI) coating on bacterial biocoagulation. *Bioresource Technology* 166, 266-272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.060>

Aguilera, M., Reina, Y., Orozco, A., Yabrudy, J., Barcos, R. (2013). Composición de la Economía de la Región Caribe de Colombia. Ensayos sobre economía regional. Banco de la República. 53. [http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/eser\\_53\\_caribe\\_2013.pdf](http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/eser_53_caribe_2013.pdf)

Alam, A., Wan, C., Guo, S., Zhao, X., et al. (2014) Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *Bioscience and Bioengineering*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.021>

Aldana, A., Di Mare, L., Navas, A. (2017) *Chlorella* sp. cultivation using feedstocks as nutrition medium and its comparison to BBM techniques. 7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. doi: 10.13140/RG.2.2.30273.35689

Andersen, R., Berges, J., Harrison, P., Watanabe, M. (2005) Recipes for Freshwater and Seawater Media, en *Algal Culturing Techniques*. Elsevier. App. A.

Behrens, P. (2005) Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae, en *Algal Culturing Techniques*. Elsevier. Cap. 13.

Bilad, M., Discart, V., Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., Vankelecom, I. (2014) Coupled cultivation and pre-harvesting of microalgae in a membrane photobioreactor (MPBR). *Bioresource Technology* 155, 410–417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.026>

Borowitzka, M. (2013) High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-013-9983-9

Burlew, J. *Algal culture: from laboratory to pilot plant*. Carnegie (1953). Jacob-Lopez, E., Cacia Ferreira, L. M., Teixeira Franco, T., *Biomass production and carbon dioxide fixation by Aphanothece microscopica Nageli in a bubble column photobioreactor*. *Biochemical Engineering*, 2008. 40: p. 27-34.

Barsanti, L., Gualtieri, P. (2006). *Algae, Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis

- Calvo, F., Bula, A., Di Mare, L., García, S. (2017) CFD simulation of multiphase (liquid–solid–gas) flow in an airlift column photobioreactor. *Acta Mechanica*. March, Vol. 228, No. 7. DOI 10.1007/s00707-017-1828-1
- Camargo, L. Arboleda, M.N. Cardona, E. (2013). Producción de energía limpia en Colombia, la base para un crecimiento sostenible. XM, Compañía Expertos en Mercados, Filial de ISA, Colombia. Recuperado de: [https://www.xm.com.co/BoletinXM/Documents/MDLColombia\\_Feb2013.pdf](https://www.xm.com.co/BoletinXM/Documents/MDLColombia_Feb2013.pdf)
- Cañizares-Villanueva, R., Contreras-Flores, C., Flores-Cotera, L., Peña-Castro, J. (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 28: p. 450 - 456.
- Cheremisinoff, N. (2002) *Handbook of Air Pollution, Prevention and Control*. Elsevier 14.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Chiu, S.Y., Kao, C. Y., Chen, C. H., Kuan, T. C., Ong, S. C., Lin, C. S., (2008) Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*. 99: p. 3389-3396. doi:10.1016/j.biortech.2007.08.013
- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J., et al. (2012) Avances en el Diseño Conceptual de Fotobiorreactores para el Cultivo de Microalgas. *Asociación Interciencia*.
- Coral, J., et al. (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Inci* 65.
- Corominas, J. (2014). Los primeros minutos del efecto invernadero. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*. Universidad de Cádiz. 11 (1), 100-107. DOI: 10498/15716
- Darzens, A., Pienkos, P., Edye, L. (2010) Current Status and Potential for Algal Biofuel Production. *IEA Bioenergy*.
- Das, D., Nejat Veziroglu, T. (2001) Hydrogen production by Biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 26: p. 13-28.
- Demirbas, A., Fatih Demirbas, M. (2010) *Algae Energy, Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer. P. 40 - 90.

- Dyson, F. (2008). El problema del calentamiento global. Publicado originalmente en The New York Review of Books, 55 (10). Reeditado en Estudios públicos (2008). 112. 83-118. Recuperado de:  
[https://www.cepchile.cl/cep/site/artic/20160304/asocfile/20160304094739/r112\\_Debate\\_CalentamientoGlobal.pdf](https://www.cepchile.cl/cep/site/artic/20160304/asocfile/20160304094739/r112_Debate_CalentamientoGlobal.pdf)
- FAO. (2009) Algae-Based Biofuels: A Review of Challenges and Opportunities for Developing Countries, 9-12.  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/aquaticbiofuels/docs/0905\\_FAO\\_Review\\_Paper\\_on\\_Algae-based\\_Biofuels.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/aquaticbiofuels/docs/0905_FAO_Review_Paper_on_Algae-based_Biofuels.pdf)
- Fisher, A., Burlew, J. (1953) Possible use of Microscopic Algae. In: Burlew, J. Algal culture: from laboratory to pilot plant. Carnegie.
- García-Pérez, S., Beuckels, A., Vandamme, D., Depraetere, O., Foubert, I., Parra, R., Muylaert, K. (2014) Influence of magnesium concentration and pH on flocculation of *Chlorella vulgaris*. Algal Research 3: p. 24-29.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.016>
- Gerardo, M. et al. (2015) Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. Algal Research 11 248–262.
- González, S., Perales, H., Salcedo, M. (2008) La Fluorescencia de la Clorofila a Como Herramienta en la Investigación de Efectos Tóxicos en el Aparato Fotosintético de Plantas y Algas. Revista de Educación Bioquímica 27(4): 119-129.
- Grima, E.M., Belarbi, E.H., Fernandez, F.A., Medina, A.R., Chisti, Y. (2003). Recovery of micro algal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnol. Adv. 20 (7), 491–515.
- Gutiérrez, H., de la Vara, R. (2012) Análisis y Diseño de Experimentos. McGraw Hill, 3ª. 210-220
- Isaza, J. y Campos, D. (2009) Valoración Histórico-Crítica del Cambio Climático. La Tadeo, 74.
- Jorgensen, J., Convit, J. (1953) Cultivation of complexes of algae with other freshwater microorganisms in the tropics. In: Burlew, J. Algal culture: from laboratory to pilot plant. Carnegie.
- Kemira (2007) Hoja de datos de seguridad PAX-18
- Kemira (2008) Ficha Técnica PAX-18.

- Khoo, H., Sharratt, P., Das, P., Balasubramanian, R., Narahariseti, P., Shaik, S. (2011) Life cycle energy and CO<sub>2</sub> analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. *Bioresource Technology*. 102 5800–5807. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.055
- Lananan, F., Mohd Junos, F., Mohdm Nasir, N., Abu Bakar, N., Lam, S., Jusoh, A. (2016) Optimization of biomass harvesting of microalgae, *Chlorella* sp. utilizing auto-flocculating microalgae, *Ankistrodesmus* sp. as bio- flocculant. *International Biodeterioration & Biodegradation* xxx 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.022>
- Lardon L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J., Bernard, O. (2009) Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology*. 43, (17) pp. 6475–6481.
- Lemmens, B. (2010) State of the art of algae biofuel production. *AQUAFUEL FPT7*.
- Liu, J., Zhu, Y., Tao, Y., Zhang, Y., Li, A., Li, T., Sang, M., Zhang, C. (2013) Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. *Biotechnology for Biofuels* 6, 98. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/98>
- Mann, M. (2014) False Hope. *Scientific America* 310.
- Markou, G., et al. (2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*. 65, 186-202.
- Mata, T.M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2009) Microalgae for Biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: p. 217-232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- Melis, A. (2002) Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: p. 1217-1228.
- Melo-Becerra, L., Ramos-Forero, J., Hernández-Santamaría, P. (2016) La educación superior en Colombia: situación actual y análisis de eficiencia. *Desarrollo y Sociedad* 78. Universidad de los Andes. <https://doi.org/10.13043/dys.78.2>
- Mendoza, J. (2015). Estudio y Caracterización Teórico-Experimental del Proceso de Gasificación de Biomasa Residual con Adición de Vapor. Tesis Doctoral. Universidad del Norte.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 631 de 2015.
- Ministerio de Hacienda y Crédito Público. Decreto 926 de 2017.



- Molina, E., Fernández, J., Acien, F.G., Chisti, Y. (2001) Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*. 92, 113–131.
- Montgomery, D. (2008) *Diseño y Análisis de Experimentos*. Limusa Wiley. 2ª. 218-366.
- Moreno-Franco, D. Quintero-Manzano, J. & López- Cuevas, A. (2010). Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *Contactos*. 78, 25-33. Recuperado de:  
<http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/eutrofia2.pdf>
- Moussa, D., El-Naas, M., Nasser, M., Al-Marri, M. (2017) A comprehensive review of electrocoagulation for water treatment: Potentials and challenges. *Journal of Environmental Management* 186, 24-41.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.10.032>
- NOAA. What is Aquaculture. Fisheries Home, Aquaculture.  
[http://www.nmfs.noaa.gov/aquaculture/what\\_is\\_aquaculture.html](http://www.nmfs.noaa.gov/aquaculture/what_is_aquaculture.html)
- O'Connell, D., Savelski, M., Stewart Slater, C. (2013) Life cycle assessment of dewatering routes for algae derived biodiesel processes. *Clean Techn Environ Policy*. 15:567–577 DOI 10.1007/s10098-012-0537-7.
- Pankratz, T. (2000) *Environmental Engineering Dictionary and Directory*. Lewis. P. 25.
- Pardo, Y., Herrera, I., González, A., Kafarov, V. (2013) Environmental Assessment of Microalgae Biodiesel Production in Colombia: Comparison of Three Oil Extraction Systems. *Ciencia, Tecnología y Futuro - Vol. 5 Num. 2 Jun. P. 85 – 100*
- Pellón, A., et al. (2003) Empleo de microalga *scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Metalurgia*. 39: 9-16.
- Preisig, H., Andersen, R. (2005) *Historical Review of Algal Culturing Techniques en Algal Culturing Techniques*. Elsevier. Cap. 1.
- Pupo, O., García, S., Paternina, E., Bula, A., et al. (2013) Comparison of Two Different Vertical Column Photobioreactors for the Cultivation of *Nannochloropsis* sp. *Energy Resources*.  
<http://energyresources.asmedigitalcollection.asme.org/> on 05/30/2013  
Terms of Use: <http://asme.org/terms>
- Rawat, I., Ranjith, R., et al. (2005) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. 103, 444-467.

- Roselet, F., Vandamme, D., Roselet, M., Muylaert, K., Abreu, P. C. (2015). Screening of commercial natural and synthetic cationic polymers for flocculation of freshwater and marine microalgae and effects of molecular weight and charge density. *Algal Research*, 10, 183-188. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.05.008>
- Salim, S., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H. (2012) Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. *Bioresource Technology*. 118, 49–55.
- Salim, S., Gilissen, L., Rinzema, A., Vermuë, M., Wijffels, R. (2013) Modelling microalgal flocculation and sedimentation. *Bioresource Technology*. 144, p. 602-607,
- Samarasingue, N., Fernando, S. (2015) Moisture displacement and simultaneous migration of surface-functionalized algae from water to an extraction solvent using ionic polyelectrolytes. *Renewable Energy* 81, 639-643.
- Sander, K., Murthy, G. (2010) Life cycle analysis of algae biodiesel. Springer-Verlag.
- San Pedro, A., González López, C.V., Acien, F.G., Molina Grima, E. (2013) Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 134, 353–361
- Sazdanoff, N. (2006) Modeling and Simulation of the Algae to Biodiesel Fuel Cycle. Tesis de Maestría The Ohio State University.
- Shao, P., Darcovich, K., et al. (2015) Algae-dewatering using rotary drum vacuum filters: Process modeling, simulation and techno-economics. *Chemical Engineering Journal* 268, p. 67-75.
- Slade, R., Bauen, A. (2013) Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*. 53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019>
- Soeder, C. (2010) The scope of microalgae for food and feed. In: Grobbelaar, J..Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth Res* 106 p. 135–144.
- Takeshita, T. (2011) Competitiveness, role, and impact of microalgal biodiesel in the global energy future. *Applied Energy* 88. P. 3481-3491.
- Tapias-Ortega, J.M. (2017). Pobreza y violencia en la Región Caribe colombiana: un enfoque espacial. *Ensayos sobre política económica*. 35. 139-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.espe.2016.12.002>

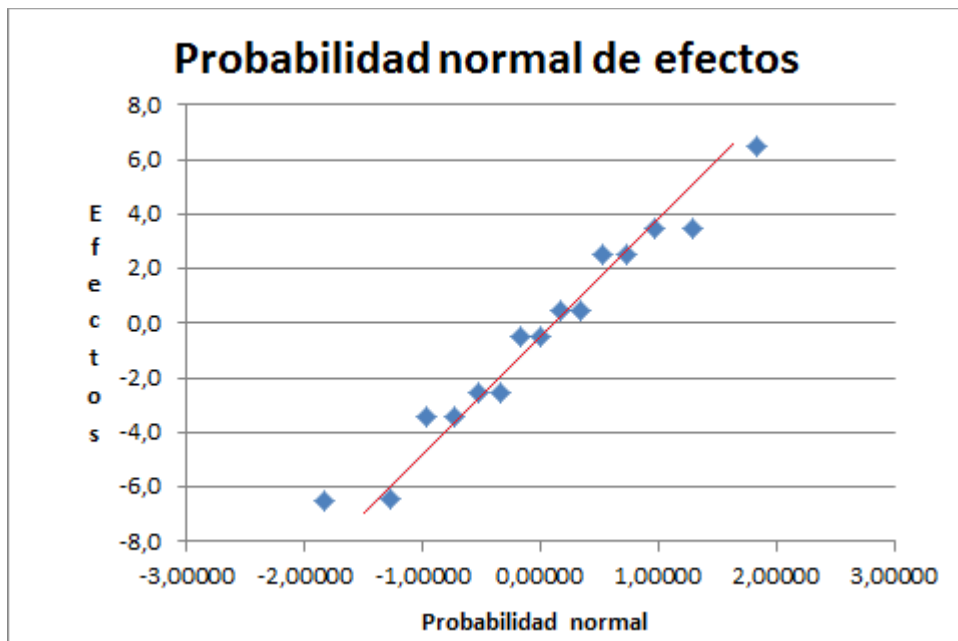
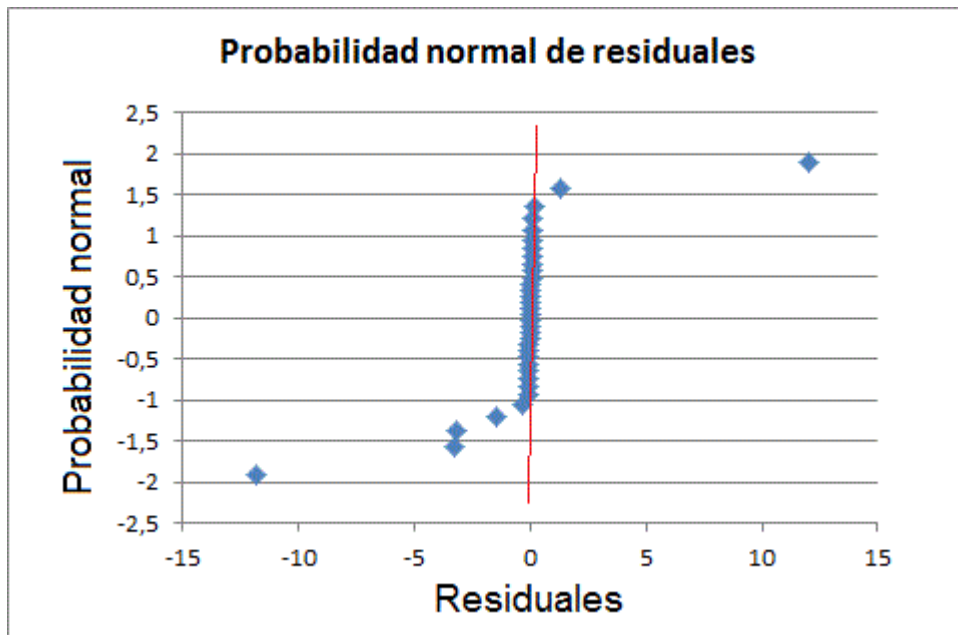
- Tchobanoglous, G., Burton, F., Stensel, H. (2003) Wastewater Engineering. Metcalf & Eddy, McGraw Hill. 345-346.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99: p. 4021-4028.
- Usi, N., Ikenouchi, M., (1997) The Biological CO<sub>2</sub> Fixation and Utilization Project by RITE - Highly effective Photobioreactor System. *Energy Conversion Management*. 38: p. 487-492.
- Vandamme, D., Foubert, I., and Muylaert, K. (2013) Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, Vol. 31, No. 4
- Vandamme, D., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I. (2014) Floc characteristics of *Chlorella vulgaris*: Influence of flocculation mode and presence of organic matter. *Bioresource Technology* 151: p. 383–387
- Vandamme, D., Eyley, S., Van den Mooter, G., Muylaert, K., Thielemans, W. (2015) Highly charged cellulose-based nanocrystals as flocculants for harvesting *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 194: p. 270–275
- Van den Hende, S., Vervaeren, H., Desmet, S., Boon, N. (2011) Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New Biotechnology*.
- Velásquez-Lozano, M. (2018). Estimación de la huella de carbono de fuentes fijas industriales de la ciudad de Barranquilla (tesis de maestría). Maestría en ingeniería ambiental. Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia. Recuperado de:  
<http://manclar.uninorte.edu.co/bitstream/handle/10584/8238/133561.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Verdeza, A., Ahumada, L., Bula, A. (2015) Chemical Equilibrium Model for Fixed-Bed Gasification to Assess Biomass Energy Content. ASME 2015 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. Volume 6A: Energy.

## Apéndice

### Anexo 1

#### Gráficos de probabilidad normal de los experimentos

##### Experimento de barrido



## Experimento de optimización

